

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO REPRODUCCION ANIMAL

PROYECTO FIA PI- C-2004-1-P-047
INFORME TECNICO Y DE GESTION FINAL



VALDIVIA, 25 DE JUNIO DE 2008

INFORME TECNICO Y DE GESTION

EJECUTOR: Universidad Austral de Chile.

NOMBRE DEL PROYECTO: "Centro Tecnológico de Reproducción de ovinos de alta calidad".

CODIGO: PI-C-2004-1-P-O47

Nº INFORME: Final

PERIODO: Diciembre de 2004 a Junio de 2008

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO: Dr. Jorge E. Correa Soto.

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCION	

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	04 JUL. 2008
Hora	11:30
Nº Ingreso	3312

RESUMEN EJECUTIVO DEL PROYECTO

El presente informe complementa el Informe Final entregado en Abril sobre las actividades realizadas en el proyecto FIA PI-C-2004-1-P-047 "Centro tecnológico de Reproducción de ovinos de alta calidad" entre el 1 de Diciembre de 2004 al 20 de Abril de 2008.

Con el propósito general de diseñar un modelo conceptual y gestión operativa de un Centro Tecnológico de reproducción de ovinos de alta calidad se propusieron los objetivos específicos de: 1. Validar la técnica de punción folicular mediante laparoscopia, 2. Mejorar la tasa de FIV, 3. Desarrollar la técnica de cultivo *in vitro* de embriones ovinos, 4. Desarrollar la técnica de crioconservación de embriones ovinos.

Los resultados obtenidos en este proyecto, aunque en pequeña escala, si se consideran junto al incremento de la actividad ovina que se está produciendo y la carencia de una institución dedicada específicamente a estas actividades avalan el esfuerzo de FIA y la UACH en realizar este estudio para un eventual Centro Biotecnológico dedicado a la reproducción ovina y posiblemente a otras especies de carácter productivo.

II. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

En la Tabla 1. se presentan los resultados esperados en relación a los resultados obtenidos

Tabla 1. Resultados obtenidos por Objetivo

Objetivo	Resultado	Indicador	%
1	Punción folicular validada	4,6 COCs obtenidos / 4,3 COCs esperados	>100
2	Tasa de FIV mejorada	65% / 80%*	81,2
3	Cultivo de embriones desarrollado	55% / 80%**	68,7
4	Crioconservación de embriones desarrollada	100% / 80%***	>100
5	Modelo conceptual gestión operativa de Centro Tecnológico de Reproducción desarrollado	100% / 100%****	100
6	Resultados difundidos	Boletines y charlas	50

- * Tasa de Fecundación in vitro ideal, usada como referencia, obtenida con oocitos de bovino previamente en algunos ensayos en el Instituto de Reproducción Animal.
- ** Porcentaje máximo exagerado como desarrollo de embriones en relación al número de ovúlos fecundados in vitro en bovinos
- *** Se refiere al porcentaje de desarrollo de la técnica de congelación de embriones
- **** Modelo desarrollado, incluso se presentó postulación de creación de un centro al Concurso de pre-competitividad de CORFO 2007

El análisis de estos resultados demuestra que la punción folicular quedó adecuadamente validada, determinándose una duración de 15 minutos por oveja, con una frecuencia de 14 días por animal, una tasa de recuperación de 79,5% y un promedio de 4,6 COCs por oveja por sesión. Este resultado es superior al esperado porque en el proyecto anterior (FIA BIOT 01 P 063) se había establecido una cosecha de 4,3 COCs por oveja. Esta superación no fue fácil porque hubo cambio de personal y cada persona necesita entrenamiento que puede alcanzar los tres meses y varias ovejas destinadas solamente a este fin.

La tasa de 65% de FIV alcanzada en el último ensayo aunque representa un 81,2 % de la tasa esperada puede considerarse extraordinaria. Esto es porque el 80% planteado era demasiado alto e hipotético; este 80% de referencia fue formulado tomando en cuenta algunos resultados que habíamos alcanzado esporádicamente en FIV con ovocitos bovinos. En el ovino, los datos nuestros eran escasos y muy bajos; de hecho durante la mayor parte de la ejecución del proyecto este índice estaba alrededor de 20%. Conviene hacer notar que la incorporación de Guillermo Mogollón al proyecto facilitó alcanzar este resultado final, lo que implica que no solo las recetas son válidas sino que también “la mano” es más relevante.

De igual manera, el cultivo in vitro de embriones ovinos de 55% de formación de blastocistos en referencia a los óvulos fecundados logrado en el último ensayo puede considerarse es muy alto porque el 80% planteado es casi utópico ya que incluso in vivo, es decir en el oviducto de las hembras hay un porcentaje natural de mortalidad embrionaria temprana que supera el 20%.

En relación a la crioconservación de embriones desarrollada se ha considerado superada en mayor porcentaje del esperado porque además de la congelación, se logró implementar la vitrificación de embriones tanto ovinos como bovinos. La vitrificación de embriones es una biotécnica más moderna, simple y no requiere equipamiento mayor, por lo tanto podría aplicarse incluso a nivel de terreno.

La construcción del modelo conceptual del Centro parece cumplida porque se plantea un centro que aplique las biotecnologías desarrolladas para producir gametos ovinos, tener acceso a animales genéticamente valiosos, relacionarse con núcleos genéticos, y que el material producido llegue finalmente a los productores. Se plantea un esquema de relación entre ellos. Además durante la ejecución del proyecto se pudo mantener algunos animales y fue posible producir en forma concreta cierta cantidad de gametos de razas especializadas.

En relación al sexto objetivo, se realizó charlas en Osorno, Loncoche y clases en Valdivia. Se ha puesto un porcentaje mas bajo de resultado obtenido/esperado porque no se distribuyó un par de boletines preparados en cuanto a carneros disponibles y características de razas ovinas porque se esperaba superar tasas de FIV y cultivo de embriones in vitro que fueron bastante difíciles de obtener. Sin embargo, debe destacarse que se realizaron tres tesis para obtener el título de Médico Veterinario y se apoyó la realización de una tesis de Maestría en Reproducción Animal y una tesis a nivel de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Este último material tiene un valor de difusión natural como tesis misma pero además esta la posibilidad de publicaciones científicas originadas de su trabajo.

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO

Tabla 2. Resultados obtenidos por Actividad

Ob.	Actividad	Resultado	Indicador	% Inicial	% Final
1	1	Punción folicular validada	Tasa obtenida / Tasa esperada	30	100
2	2	Tasa de FIV mejorada	Tasa de FIV	20	65*
3	3	Cultivo de embriones desarrollado	% embriones viables	0	35** 55***
4	4	Crioconservación de embriones desarrollada	% embriones crioconservados adecuadamente	0	72
5	5	Modelo de Centro Tecnológico de Reproducción desarrollado	% Modelo desarrollado	0	100
6	6	Resultados difundidos	Número de boletines y Charlas	0	60

- * Tasa de Fecundación in vitro obtenida con oocitos de ovinos y bovino.
- ** Desarrollo de blastocistos en cultivo in vitro en relación al número de ovocitos a fecundar

*** Desarrollo de blastocistos en cultivo in vitro en relación al número de ovocitos fecundados

1.- Validación de Punción Folicular mediante laproscopía

Inmovilización y preparación previa

Las intervenciones laparoscópicas fueron realizadas en el quirófano del Pabellón del Instituto de Reproducción Animal que dispone de un pequeño laboratorio que se implementó para la búsqueda de los COC`s, éste cuenta con una lupa estereoscópica, una platina térmica, una estufa (sin gases) para mantener constante la temperatura de los medios. Junto a este laboratorio se encuentran los corrales para mantener el rebaño de ovejas.

Para la ejecución de la técnica se inmovilizó a cada hembra, sobre una camilla de sujeción, se depiló, lavó y desinfectó la zona abdominal. Para mantener a los animales relajados sobre la camilla se utilizó Acepromacina (Pacifor®, Drag Pharma) en dosis de 0.025 mg/Kg. intramuscular; las laparoscopías se realizaron luego de 10 a 15 minutos de la aplicación del tranquilizante.

Punción ovárica mediante laparoscopia

Una vez en posición el animal sobre la camilla se indujo neumoperitoneo, por insuflación de aire a través de una aguja Verres que atraviesa la pared abdominal, el neumoperitoneo facilita el uso de los otros trocares.

Para la visualización de los ovarios se utilizó un laparoscopio (Kart Storz®, modelo Hopkins 26031BA) ayudado de una pinza (Endo Grasp ®) para exponer las estructuras, ambos implementos fueron introducidos a la cavidad abdominal a través de dos perforaciones paralelas unos 5 a 10 cm por delante de cada glándula mamaria realizadas con punzones y trocar de 9 mm de diametro (Kart Storz®, modelo 26031 GT). Para la punción de los folículos fueron utilizados agujas de 21G (BD Asepto®, Becton, Dickinson Ind.) adosadas al extremo de una pipeta de inseminación artificial (para mantener la

4. Preparación de la célula espermática

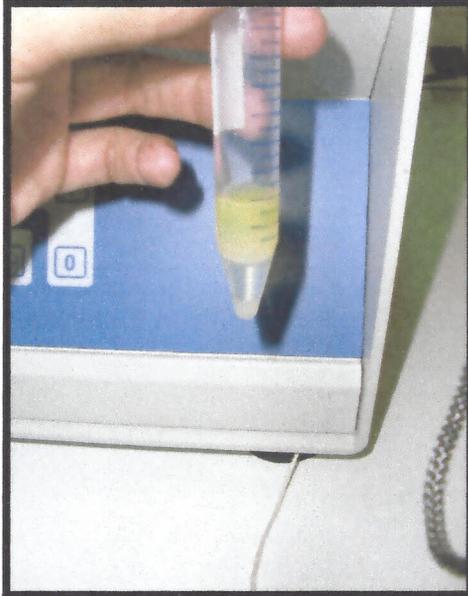
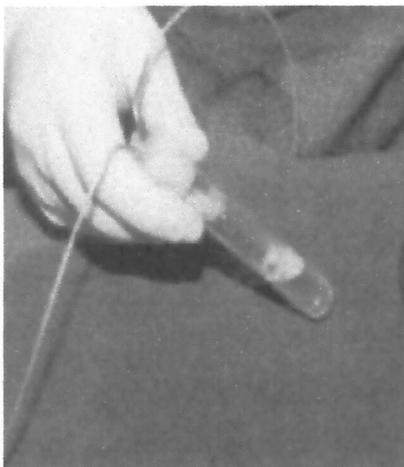


Figura 4. Selección de espermatozoides móviles por centrifugación. Nótese el Pellet al fondo del tubo.

- Los COC's se inseminaron empleando semen de un toro (espedo) procedente del Centro de Inseminación Artificial.
- Cada pajuela fue descongelada en baño María a 35°C por 30 segundos. Una vez descongelada la pajuela, se procedió a secarla protegiéndola siempre de la luz directa. Empleando tijeras limpias se cortó uno de los extremos de la pajuela y poniendo el extremo cortado de la pajuela contra la pared interna de un tubo Eppendorf de 2 ml se cortó el otro extremo de la pajilla, vertiendo el semen hacia el tubo escurriendo por la pared.
- Usando láminas porta y cubreobjeto se procedió a verificar la motilidad espermática bajo microscopio contraste de fases.
- Espermatozoides móviles fueron obtenidos por centrifugación en gradientes discontinuos de percoll y llevados posteriormente a concentraciones entre 1.5 a 2 millones de espermatozoides/ml en medio IVF TALP + heparina.

sonda rígida) que contiene en su interior una sonda de levin de 2.66 mm de diámetro (Pennine®, Sonda de alimentación pediátrica LT 2208) que desemboca en un tubo de 15 ml (Falcon), para introducir la aguja de punción se realizó una perforación con un trocar y punzón de 6 mm de diámetro (Kart Storz®, modelo 26172 C) en la línea media algunos cm caudal a las punciones más laterales, cabe mencionar que el material quirúrgico se encontraba estéril y era esterilizado con agua a punto de ebullición entre cada laparoscopia. La bomba de aspiración ejerce presión negativa máxima de 40 mm de Hg. Luego de la laparoscopia las heridas producidas por los trocar fueron desinfectadas con Larvispray® (Pfizer) cada oveja recibió una inyección de oxitetraciclina (Steclin LA max®, Novartis) en dosis de 20 mg/kg via intramuscular.

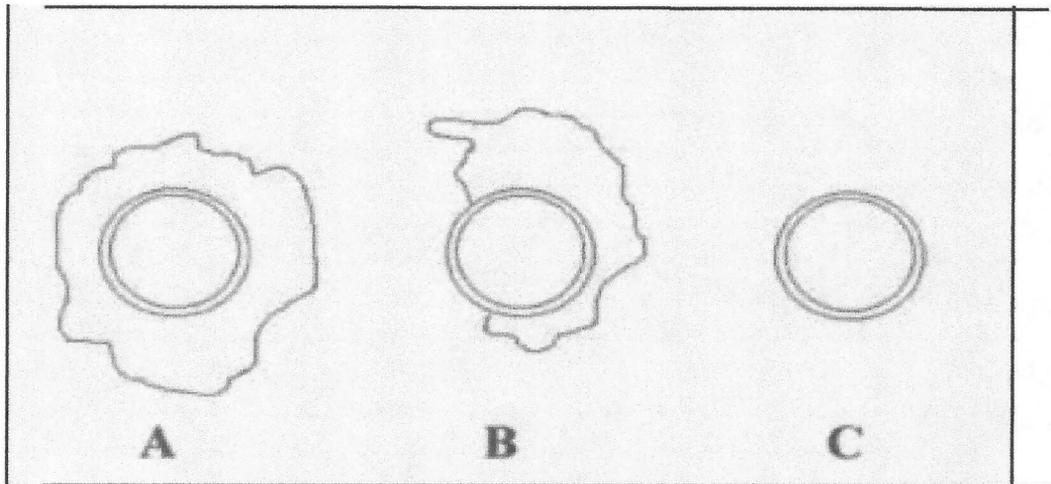
El medio de recuperación utilizado fue el Dulbecco-PBS 1% de suero fetal bovino, para evitar la coagulación de la sangre aspirada se utilizó heparina (Heparina Sodica, Laboratorio Chile) en el medio de recuperación en una concentración de 100 U.I./ml. Actualmente se utiliza una concentración mas baja de heparina 50 U.I./ml debido que al afinar la técnica de punción folicular los problemas debidos a contaminación con sangre son menores. Para transportar los ovocitos al laboratorio se utilizo el medio TCM-199 de lavado



Tubo de recolección con líquido folicular.

Selección de los COC`s

Una vez en el laboratorio, los COC`s fueron elegidos en base a una evaluación morfológica en la cual se seleccionaron ovocitos de tamaño homogéneo, con cúmulus compacto y con un citoplasma de granulación fina y uniforme. Se descartaron inmediatamente aquellos ovocitos demasiado pequeños o demasiado grandes desnudos o con cúmulus muy oscuro; así también aquellos que tenían un citoplasma de aspecto irregular con áreas decoloradas.



Esquema de los COC según la integridad de los cúmulos, A completamente rodeados por células, B parcialmente rodeados por células y C ovocito desnudo.

Los ovocitos seleccionados fueron lavados 2 veces en medio de maduración (TCM-199 modificado con Hapes) compuesto por sales Earle's y suplementado con piruvato de sodio en una concentración de 0,2 mM, sulfato de gentamicina (Sigma) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, FSH (Sigma) 0,02 unidades/ml, estradiol 17- β 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma) y suero fetal bovino al 10%. Posteriormente fueron transferidos a una placa Petri (Falcon 1008) que contenía gotas de 50 μl de solución TCM-199 de maduración recubiertas de aceite mineral (Sigma-aldrich). Los COC`s logrados de esta forma fueron cultivados a 38,5°C por un lapso de 24 horas en estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO_2 al aire.

Para cumplir con el objetivo 2. Mejoramiento de la tasa de FIV

1.- Maduración *In vitro*

1. Equipos

- Pipeteador automático de 10 ul y sus respectivas puntas desechables.
- Incubador de CO₂.
- Campana de flujo laminar.
- Lupa estereoscópica.
- Platina temperada.

2. Materiales

- Placas Falcon 351008 y 351007.
- Medio completo para lavado de ovocitos.
- Medio completo de maduración.
- Aceite mineral equilibrado en estufa de CO₂.

3. Procedimiento empleado

- Una vez los COC's seleccionados y lavados en medio PBS Dulbecco, se transfirieron a placas Petri Falcon 351008 conteniendo medio TCM Hepes Bufferado de lavado + 10% de suero fetal .
- Posteriormente los COC's se colocaron en gotas de 50 ul (8 COC's/gota) conteniendo medio completo de maduración. Cabe indicar que tanto el medio TCM Hepes Bufferado de lavado y las gotas con medio completo de maduración se cubrieron con aceite mineral y se equilibraron previamente al menos 2 horas en estufa de CO₂ al 5% + aire y 38.5°C. del mismo modo la maduración ovocitaria también se llevó a cabo

bajo las mismas condiciones de atmósfera controlada por un mínimo de 24 horas.

2.- Fecundación in Vitro Bovinos

Aspiración, Búsqueda y Selección de ovocitos

1. Equipos

- Baño María.
- Bomba de aspiración unido al sistema de aspiración folicular.
- Lupa estereoscópica.
- Platina térmica para lupa estereoscópica a 38.5°C
- Placa calefactora a 38°C.
- Pipetas automáticas de 10 ul .

2. Materiales

- Placas Petri de 60 y 100 mm.
- PBS Dulbecco.
- Tips de 10 ul.
- Tubos de 50 ml Falcon 352098 fondo cónico.
- Lápices.
- Papel toalla desechable e higiénico.

3. Procedimiento empleado

- Después de traer los ovarios del matadero en termos; los ovarios fueron enjuagados con la misma solución de transporte (solución salina 0.9% + antibióticos) y colocados en recipientes estériles conteniendo medio limpio a 35°C.

4. Preparación de la célula espermática

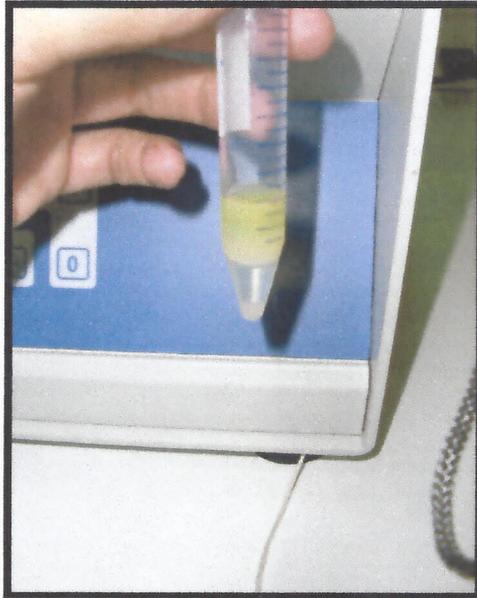


Figura 4. Selección de espermatozoides móviles por centrifugación. Nótese el Pellet al fondo del tubo.

- Los COC's se inseminaron empleando semen de un toro (espedo) procedente del Centro de Inseminación Artificial.
- Cada pajuela fue descongelada en baño Maria a 35°C por 30 segundos. Una vez descongelada la pajuela, se procedió a secarla protegiéndola siempre de la luz directa. Empleando tijeras limpias se cortó uno de los extremos de la pajuela y poniendo el extremo cortado de la pajuela contra la pared interna de un tubo Eppendorf de 2 ml se cortó el otro extremo de la pajilla, vertiendo el semen hacia el tubo escurriendo por la pared.
- Usando láminas porta y cubreobjeto se procedió a verificar la motilidad espermática bajo microscopio contraste de fases.
- Espermatozoides móviles fueron obtenidos por centrifugación en gradientes discontinuas de percoll y llevados posteriormente a concentraciones entre 1.5 a 2 millones de espermatozoides/ml en medio IVF TALP + heparina.

bajo las mismas condiciones de atmósfera controlada por un mínimo de 24 horas.

2.- Fecundación in Vitro Bovinos

Aspiración, Búsqueda y Selección de ovocitos

1. Equipos

- Baño María.
- Bomba de aspiración unido al sistema de aspiración folicular.
- Lupa estereoscópica.
- Platina térmica para lupa estereoscópica a 38.5°C
- Placa calefactora a 38°C.
- Pipetas automáticas de 10 ul .

2. Materiales

- Placas Petri de 60 y 100 mm.
- PBS Dulbecco.
- Tips de 10 ul.
- Tubos de 50 ml Falcon 352098 fondo cónico.
- Lápices.
- Papel toalla desechable e higiénico.

3. Procedimiento empleado

- Después de traer los ovarios del matadero en termos; los ovarios fueron enjuagados con la misma solución de transporte (solución salina 0.9% + antibióticos) y colocados en recipientes estériles conteniendo medio limpio a 35°C.

para ser diluido con Dulbecco-PBS 1% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de gentamicina. La selección de los COC`s se realizó con una pipeta Pasteur, bajo una lupa estereoscópica en base a la evaluación morfológica antes descrita. Los COC`s seleccionados fueron lavados 3 veces en medio de maduración antes de ser puestos en grupos de 10 COC`s en las gotas de maduración. El medio de maduración utilizado es el mismo que para ovinos, los COC`s permanecieron en este medio durante 22 horas (atmósfera húmeda de CO₂ de 5% al aire).

El semen utilizado correspondió al toro Speedo, proveniente del Centro de Inseminación Artificial, pajuela de 0,25 ml. Para capacitar el semen se utilizó el medio m-SOF IVF adicionado de 5 mg/ml de BSA y dosis diferentes de heparina. Hasta el momento se han obtenido mejores resultados con la concentración de 50 µg/ml de heparina. Actual.

La pajuela de semen se descongeló 5 segundos al aire y 15 segundos en agua a 37° C, el contenido se vertió en un tubo de 15 ml (Falcon) por la pared del tubo. Para realizar el swim up se agregó cuidadosamente 1 ml de medio m-SOF IVF 5 mg/ml de BSA por la pared del tubo y se dejó reposar, durante 1 hora, en ángulo de 45° en el interior de la estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO₂ al aire.

Transcurrido ese tiempo se tomó cuidadosamente el sobrenadante (aproximadamente 800 µl) y se resuspendió en 4 ml de medio m-SOF IVF 5 mg/ml de BSA, se centrifugó por 5 minutos a 500 G, se removió el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 5 ml de medio m-SOF IVF 5 mg/ml de BSA y se centrifugó por ultima vez a 500 G por 5 minutos.

Se retiró el pellet de semen del fondo del tubo de 15 ml (400 µl). Y se dejó en la estufa de cultivo. Para ajustar la concentración de semen se tomaron 50 µl del semen centrifugado y se diluyeron en 950 µl de solución hiperosmótica 3% de NaCl en agua, se homogenizó la muestra

agitando en vortex y se cargó la cámara de Neubauer el número de cuentas fue cruzado con una tabla previamente creada para ajustar la concentración a 10×10^6 espermatozoides/ml luego se agregó la heparina necesaria para ese volumen y se dejó el semen nuevamente en la estufa por 10 minutos.

A los ovocitos maduros se les removió el cúmulus mecánicamente por pipeteo y lavados tres veces en gotas de 50 μ l de medio m-SOF IVF adicionado de 5 mg/ml de BSA y 50 μ g/ml de heparina para remover totalmente el medio de maduración en el que se encontraban como también las células del cúmulus restantes; en cada gota de 50 μ l se cultivan 8 a 10 ovocitos. A estas gotas se le agregaron 50 μ l de semen capacitado, ovocitos y semen permanecieron en las gotas de fecundación por un periodo de 18-20 horas en una atmósfera de mezcla gaseosa de Nitrógeno 90%, Oxígeno 5%, y Dióxido de carbono 5%, a una temperatura de 38,5°C.

El cultivo de embriones se realizó de forma idéntica al protocolo descrito para ovinos. Luego de la fecundación los ovocitos fueron sometidos a vortex durante 3 minutos en solución de hialuronidasa al 0,1%. Para determinar el porcentaje de ovocitos maduros fueron observados bajo una lupa estereoscópica con aumento de 40 X.

Cultivo *In vitro* de embriones

Dieciocho horas después de realizada la fecundación los COC's fecundados se pusieron en gotas de cultivo por 7 días. Blastocistos y blastocistos expandidos fueron evaluados morfológicamente y criopreservados.

1. Equipos

- Pipeteador automático de 100 μ l y sus respectivas puntas desechables.

- Incubador de CO₂.
- Campana de flujo laminar.
- Lupa estereoscópica.
- Microscopio contraste de fases.
- Platina temperada.

2. Materiales

- Placas Falcon 351008 y 351007.
- Medio SOFaa + 10% de suero fetal.
- Medio Hepes Talp.
- Aceite mineral equilibrado en estufa de CO₂.

3. Zigotos a medio de cultivo

- Tiempo después de la incubación conjunta de COC's y espermatozoides; los cigotos fueron desnudados mecánicamente y lavados dos veces en gotas de 60 ul Hepes Talp previamente equilibradas a 38.5°C y en atmósfera no controlada.
- Posteriormente los COC's fecundados y lavados en la segunda gota de Hepes Talp fueron traspasados a sus respectivas gotas de cocultivo cuyo medio fue reemplazado previamente con SOFaa+10% de suero fetal.
- Una vez terminado el proceso de co-cultivo las placas fueron puestas en el incubador de CO₂ al 5% + aire. Cada 72 horas el medio fue renovado con medio fresco de SOFaa+10% de suero fetal previamente equilibrado en CO₂.
- El día 7 y 8 los embriones transferibles en estado de blástula, blástula expandida y eclosionados fueron retirados de sus respectivas gotas de co-cultivo para su criopreservación posterior.

Para cumplir el objetivo 4. Crioconservación de embriones

Congelación de embriones ovinos

Embriones recuperados de ovejas de razas especializadas que fueron inducidas a superocular con un tratamiento en base a progesterona y FSH (descrito en INFORME N° 3) fueron congelados de acuerdo al siguiente procedimiento:





Evaluación de los ova recuperados

Los *ova* recolectados se observaron en placas Petri con un microscopio estereoscópico a 20-30x, evaluándose su estado de desarrollo siendo clasificados en cuatro grados de calidad: Grado 1, calidad excelente y buena; Grado 2, calidad regular; Grado 3, calidad pobre y Grado 4, calidad degenerado o muerto.

Exposición al crioprotector

Todas las soluciones para la congelación de los embriones se prepararon con los crioprotectores disueltos en medio Dulbecco con suero fetal bovino. Los embriones fueron expuestos al crioprotector

etilenglicol en dos etapas de 10 minutos, una a 0,75 molar y otra a 1,5 molar.

Envasado de los embriones

Los embriones fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml identificadas según el código de la IETS; con leves modificaciones.

Congelación de los embriones

Las pajuelas se colocaron en una máquina congeladora (Program Freezer ET-1N, FHK, Japón) en baño de alcohol a 18° C, enseguida se aplicó una velocidad de enfriamiento de 1°C/min hasta -7°C manteniendo 5 min esa temperatura, se hizo el *seeding* y se mantuvo -7° C por otros 5 min y luego se hizo disminuir la temperatura 0,3°C/min hasta alcanzar -35° C. Desde -35° C las pajuelas fueron lanzadas directamente a N₂L (-196° C).



Almacenamiento de los embriones

Las pajuelas congeladas fueron colocadas en carriles de aluminio (*cane*) debidamente identificados, donde se mantienen almacenadas a -196°C en bióstato de N₂L hasta ser usadas.

Descongelación de los embriones

La pajuela con embrión congelado fue retirada del bióstato de N₂L, manteniéndola durante 10 seg en aire y luego fue sumergida en baño María a 35° C durante 10 seg.

Remoción del crioprotector

Cada pajuela una vez descongelada se secó con toalla de papel desechable, se retiró el tapón de plástico y el otro extremo se cortó con tijera.

El contenido de la pajuela se vació en una placa Petri con unos 2 ml de 1,0 molar de sucrosa en Dulbecco durante 5 min; luego los embriones fueron cambiados a otra placa con una solución 0,25 molar de sucrosa en Dulbecco durante otros 5 min.

Vitrificación de embriones bovinos

Blastocistos bovinos producidos *in vitro*, fueron vitrificados en microgotas sobre un papel de aluminio colocado sobre N₂L. Las soluciones vitrificantes fueron: uno (SV1): medio TCM 199, con 20% de suero fetal bovino (SFB), Sulfato de Gentamicina stock (50mg/ml) y 10% (v/v) de Etilenglicol (EG), en esta los embriones se mantuvieron expuestos durante 12 a 15 minutos y posteriormente se transfirieron a la solución vitrificante dos (SV2): medio TCM 199, con 20% de SFB, 35% de Etilenglicol, 5% (v/w) de Polivilpirrolidona (PVP), Sacarosa 0.5M y Sulfato de Gentamicina stock (50 mg/ml), en esta los embriones se mantuvieron entre 25 a 30 segundos, para luego realizar la vitrificación por microgotas, las cuales tuvieron un volumen de 5 µl: estas fueron almacenadas en críoviales de 1 ml, y posteriormente se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido de almacenamiento, donde se conservaron hasta ser descongelados para su análisis.

Vitrificación de ovocitos bovinos

Maduración de ovocitos

Complejos ovocito-cumulus (COCs) de ovarios de hembras bovinas faenadas en el matadero de Valdivia fueron recuperados y madurados *in vitro*. Brevemente folículos pequeños (2-7 mm) fueron

aspirados con agujas 18 G y jeringas de 10ml en el laboratorio dentro de las 4 horas siguientes al sacrificio de los animales. El líquido folicular con los COCs recuperados se depositó en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) y mantenidos a 37°C donde se dejó decantar por 20 minutos. El sedimento fue aspirado con una pipeta Pasteur y se depositó en placas Petri para ser diluido en medio oviductal sintético modificado suplementado con 25 mM HEPES (mSOF-HEPES y 1mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los COCs seleccionados bajo una lupa estereoscópica fueron madurados *in vitro* por 20-22 horas en estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO₂ al aire a 38,5°C en gotas de 50 µl (8-12 COCs/gota) de medio de cultivo de tejidos (TCM -199) con 25 mM de HEPES (Sigma) suplementado con piruvato de Na (Sigma) 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml (Sigma), FSH 0,02 unidades/ml (Sigma), estradiol 17-β (Sigma) 1µg/ml y suero fetal bovino (Sigma) al 10% (v/v). Después de la maduración, para separar los ovocitos de las células del cúmulus que los rodean, los COCs fueron sometidos a vórtex por 4 minutos en un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía solución de Fosfato Buffer Dulbecco (DPBS) adicionada de hialuronidasa (Sigma) al 0,1%. Los ovocitos fueron lavados al menos 2 veces en mSOF-HEPES y se seleccionaron los ovocitos que se encontraban en metafase II con un visible primer corpúsculo polar, considerados ovocitos maduros.

Vitrificación de ovocitos

Se desarrolló un procedimiento de vitrificación en superficie sólida. Los ovocitos maduros libres de células del cúmulus fueron suspendidos en un medio de equilibrio (SVI) consistente de 4% etilenglicol (EG, Sigma) diluido en una solución base (SB) compuesta por TCM-199 con 25mM de HEPES (Sigma) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Sigma) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Sigma) por 12-15 minutos sobre una platina temperada a 39°C. Luego, los ovocitos se colocaron en una solución de vitrificación (SVII) consistente

de 35% EG, 5% de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) y 0,4M trehalosa (TRE, Sigma) en SB por 30 segundos. Inmediatamente, utilizando una micropipeta p10, microgotas de 3,5 μ l de SVII conteniendo 4 - 6 ovocitos se dejaron caer sobre una superficie de papel de aluminio preenfriado flotando en nitrógeno líquido. Con ayuda de una pinza preenfriada las microgotas vitrificadas fueron transferidas hacia un vial criogénico de plástico de 2 ml preenfriado y fueron almacenadas en nitrógeno líquido durante 1-3 días hasta su uso.

Descongelamiento de ovocitos vitrificados

Para descongelar los ovocitos, las microgotas vitrificadas se retiraron del vial criogénico y fueron expuestas a una solución de 2 ml de TRE 0,3M en SB por 5 minutos sobre una platina temperada a 39°C y luego los ovocitos fueron transferidos a SB por un tiempo no menor de 2 minutos. Los ovocitos se lavaron 3 veces en mSOF-HEPES y se colocaron en medio de maduración fresco por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, basado en una evaluación morfológica los ovocitos sobrevivientes a la criopreservación fueron seleccionados de acuerdo a la integridad de la zona pelúcida y presencia de un ooplasma homogéneo. Los ovocitos dañados por la solución de vitrificación fueron descartados.

Activación química de ovocitos vitrificados

Se formaron 3 tratamientos experimentales de ovocitos expuestos a la activación química: I) ovocitos vitrificados sobrevivientes a la criopreservación, II) ovocitos expuestos a las soluciones vitrificantes (control de toxicidad de los crioprotectantes) y III) grupo control de ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes. Estos 3 grupos experimentales fueron activados de acuerdo al protocolo descrito por González (2007). Brevemente, los ovocitos fueron cultivados en mSOF-Hepes conteniendo 5 μ M de ionomicina de Ca (Sigma) por 4 minutos a

39°C e inmediatamente después cultivados en gotas de 100 µl de mSOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA, 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, Sigma) y 12,5 µM de citocalasina B (Sigma) por 5 horas en atmósfera húmeda con 5% CO₂ al aire a 38,5°C.

Cultivo in vitro de embriones vitrificados

Concluidos los tratamientos para la activación artificial, los embriones fueron cultivados de acuerdo a Martínez Díaz y col (2007) por 8-9 días en gotas de 40 µl de mSOF suplementado con 3 mg/ml de BSA en estufa de cultivo a 38,5 ° C en atmósfera húmeda de 5% de CO₂ al aire. Se evaluó la tasa de división celular a los 2 días y el número de blastocistos obtenidos a los 8 días de desarrollo post-activación química de los ovocitos.

Para cumplir con el objetivo 5.

Centro Tecnológico de Reproducción

Entrenamiento de los carneros

La primera etapa fue acostumbrar a los animales al manejo y cercanía del personal (esta etapa se prolongó en los machos Dohne Merino, incluso uno de ellos, MD 2, aún no se aceptó el manejo), después se continuó con el entrenamiento propiamente tal, el que consistió en primera instancia en lograr que los carneros monten una hembra estrogenizada, inmovilizada en un brete, en presencia del operador; luego lograr exponer y desviar el pene e introducirlo en la vagina artificial y finalmente obtener un eyaculado. Una vez que el macho se habitúa al manejo hay que lograr que realice la misma rutina con una hembra que no está estrogenizada, lo que permite recolectar semen sin necesidad de tener una hembra en celo, esto da independencia de la estación reproductiva. Simultáneamente, se iba congelando semen de los animales ya entrenados.

membranas acrosómicas, por el contrario las células vivas permanecen sin teñirse debido a la integridad de sus membranas.

Se debe mencionar, que todos los eyaculados que presentaron menos de 50% de movimiento progresivo o menos 50% de espermatozoides muertos (Tinción Supravital) fueron desechados.

“Servicio” de Inseminación artificial

Se apoyó la inseminación artificial con semen fresco vía vaginal a ovejas de un productor cercano a Valdivia.

Se inseminó con semen congelado (importado) mediante laparoscopia ovejas de un pequeño productor de Chiloé

En general no hubo problemas en la aplicación de todas las técnicas descritas; la dificultad mas grande lo constituye el cambio de personal, el cual debe entrenarse en métodos que generalmente no conoce porque son tecnologías avanzadas que no están incluidas en las profesiones tradicionales, incluso las tecnólogas médicas que son preparadas para laboratorios, estas técnicas no son conocidas. Lo mismo ocurre con los estudiantes, incluso de postgrado, los cuales deben gastar tiempo en adiestrarse. Por lo tanto, lo mejor estener paciencia que al final se obtienen los resultados esperados.

Tal vez el mayor problema sea la estacionalidad reproductiva de las ovejas, lo que circunscribe la respuesta ovárica a un periodo bastante reducido durante el año, generalmente el otoño. Al no disponerse de matadero de ovejas, ni de ovejas que sean sacrificadas nos llevó a dedicar más tiempo al trabajo de maduración ovocitaria, fecundación in vitro, cultivo de embriones y congelación de embriones bovinos.

4. ACTIVIDADES REALIZADAS

Contratación de personal

Junto con el inicio del proyecto se contrató dos médicos veterinarios a media jornada cada uno. La Dra. Loreto Ortega quien había cooperado en forma administrativa en la parte final del Proyecto FIA BIOT 01 P 063 "Desarrollo e implementación de transferencia de embriones y producción *in vitro* de embriones mediante laparoscopia en rumiantes" y el Dr. Carlos Gatica, médico veterinario recién titulado, con una pequeña experiencia en laboratorio de embriones durante el desarrollo de su tesis para obtener su título profesional. Luego fueron reemplazados por un ingeniero zootecnista (Gabriela Silvers) a jornada completa y finalmente un ingeniero zootecnista (Guillermo Mogollón) quien terminó con el proyecto.

Para cumplir con el objetivo 1.

Actividad 1.- Validación de técnica de punción folicular guiada por laparoscopia (LOPU)

La punción folicular directa, de ovarios de ovejas, guiada por laparoscopia (LOPU) para la obtención de los complejos cúmulo-ovocito (COC`s) tuvo que ser aprendida y entrenada por los nuevos profesionales. Por lo tanto hubo dos etapas: una de entrenamiento y otra de trabajo propiamente tal en la técnica que se desarrolló durante diferentes períodos del proyecto, incluso un estudiante de veterinaria aprendió la técnica y participó en el proyecto estudiando el efecto de la eCG en el crecimiento folicular y cosecha de ovocitos que sirvió como tema de su trabajo de titulación como fue dado a conocer en un Informe N°3.

Inicialmente la laparoscopia se realizó con Tiopental sódico para inducir anestesia general, luego se usó únicamente un sedante,

Acepromacina, vía intramuscular obteniendo un nivel suficiente de inmovilización.

Actividad 1.1 Determinación de la cosecha de ovocitos.

Obtención de los complejos cúmulo-ovocito (COC`s)

Para disponer de ovocitos se realizó diferentes actividades, entre las cuales se describió obtención de COC's por punción folicular a través de laparoscopia, punción folicular de ovarios expuestos mediante laparotomía y ovarios obtenidos de ovejas faenadas o sacrificadas.

Los COC`s fueron succionados con una pipeta Pasteur bajo la ayuda de una lupa estereoscópica con aumento de 30X inmediatamente después de la aspiración folicular y colocados en un tubo Eppendorf que contenía TCM-199 de lavado.

Los COCs fueron clasificados, evaluados y contados.

Maduración de ovocitos

La maduración de los COCs se realizó según protocolo establecido en nuestro Instituto y descrito en informes anteriores; sin embargo hubo dificultades en lograr una tasa alta de maduración y posterior fecundación in vitro, incluso con ovocitos bovinos que había sido establecido muchos años anteriores. Finalmente, se logró establecer una adecuada tasa de maduración de ovocitos bovinos (control) y ovinos.

Para cumplir con el objetivo 2.

Actividad 2.- Mejoramiento de la tasa de FIV

Se utilizó semen ovino fresco para realizar fecundación in vitro. Para capacitar el semen se diluyó una alícuota de 250 µl en 5 ml del medio m-SOF IVF adicionado de 3 mg/ml de BSA (Sigma A-6003) y se

centrifugó 2 veces a 250 G durante 5 minutos, para esto se utilizaron tubos de 15 ml (Falcon). En los ensayos finales de FIV en ovinos se usó semen congelado del carnero Poll Dorset. En bovinos se usó semen del Toro Speedo con reconocida capacidad fecundante en ensayos de FIV en nuestro laboratorio.

Para cumplir con el objetivo 3.

Actividad 3. Cultivo de embriones desarrollado Cultivo in vitro de ovocitos ovinos

En líneas generales el trabajo realizado con ovocitos ovinos fue similar al descrito previamente en bovinos.

Transcurridos 18 a 20 horas en las gotas de fecundación los ovocitos fueron sacados con una pipeta de 10 μ l, sometidos a vortex durante 3 minutos en solución de hialuronidasa al 0,1% para remover totalmente las células del cúmulus y los espermatozoides adheridos a él.

Los ovocitos desnudos fueron lavados 3 veces en gotas con medio m-SOF adicionada de 10% de suero fetal bovino y luego trasladados, con la ayuda de una pipeta Pasteur, a una placa Falcon 1008 que contenía gotas de 50 μ l con monocapa de células de la granulosa como co-cultivo con m-SOF adicionada de 10% de suero fetal bovino y colocados en la estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO₂ + aire.

La evaluación del desarrollo de los embriones se realizó cada 48 horas para observar el número y estado de desarrollo, este tiempo coincidió con el cambio del 50% del medio de cultivo (realizado cada 48 horas).

Cultivo in vitro de ovocitos bovinos (control)

Se utilizaron ovarios bovinos obtenidos en el matadero de Valdivia (Frival), los que fueron transportados en un termo al

laboratorio. La obtención de los complejos cúmulo-ovocito se realizó por punción folicular de folículos de 2 a 8 mm de diámetro, con una aguja de 18 G y una jeringa de 10 ml, el líquido folicular fue depositado en un tubo graduado de 50 cc (Falcon) a 37°C donde se dejó decantar por 20 minutos. Luego el sedimento fue aspirado con una pipeta Pasteur y fue depositado sobre placas Petri para ser diluido con Dulbecco-PBS 1% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de gentamicina. La selección de los COC`s se realizó con una pipeta Pasteur, bajo una lupa estereoscópica en base a la evaluación morfológica antes descrita. Los COC`s seleccionados fueron lavados 3 veces en medio de maduración antes de ser puestos en grupos de 10 COC`s en las gotas de maduración. El medio de maduración utilizado es el mismo que para ovinos, los COC`s permanecieron en este medio durante 22 horas (atmósfera húmeda de CO₂ de 5% al aire).

El semen utilizado correspondió al toro Speedo, proveniente del Centro de Inseminación Artificial, pajuela de 0,25 ml. Para capacitar el semen se utilizó el medio m-SOF IVF adicionado de 5 mg/ml de BSA y dosis diferentes de heparina.

La pajuela de semen se descongeló 5 segundos al aire y 15 segundos en agua a 37° C, el contenido se vertió en un tubo de 15 ml (Falcon) por la pared del tubo. Para realizar el swim up se agregó cuidadosamente 1 ml de medio m-SOF IVF 5 mg/ml de BSA por la pared del tubo y se dejó reposar, durante 1 hora, en ángulo de 45° en el interior de la estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO₂ al aire.

Transcurrido ese tiempo se tomó cuidadosamente el sobrenadante (aproximadamente 800 µl) y se resuspendió en 4 ml de medio m-SOF IVF 5 mg/ml de BSA, se centrifugó por 5 minutos a 500 G, se removió el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 5 ml de medio m-SOF IVF 5 mg/ml de BSA y se centrifugó por ultima vez a 500 G por 5 minutos.

Se retiró el pellet de semen del fondo del tubo de 15 ml (400 μ l). Y se dejó en la estufa de cultivo. Para ajustar la concentración de semen se tomaron 50 μ l del semen centrifugado y se diluyeron en 950 μ l de solución hiperosmótica 3% de NaCl en agua, se homogenizó la muestra agitando en vortex y se cargó la cámara de Neubauer el número de cuentas fue cruzado con una tabla previamente creada para ajustar la concentración a 10×10^6 espermatozoides/ml luego se agregó la heparina necesaria para ese volumen y se dejó el semen nuevamente en la estufa por 10 minutos.

A los ovocitos maduros se les removió el cúmulus mecánicamente por pipeteo y lavados tres veces en gotas de 50 μ l de medio m-SOF IVF adicionado de 5 mg/ml de BSA y 50 μ g/ml de heparina para remover totalmente el medio de maduración en el que se encontraban como también las células del cúmulus restantes; en cada gota de 50 μ l se cultivan 8 a 10 ovocitos. A estas gotas se le agregaron 50 μ l de semen capacitado, ovocitos y semen permanecieron en las gotas de fecundación por un periodo de 18-20 horas en una atmósfera de mezcla gaseosa de Nitrógeno 90%, Oxígeno 5%, y Dióxido de carbono 5%, a una temperatura de 38,5°C.

El cultivo de embriones se realizó de forma idéntica al protocolo descrito para ovinos. Luego de la fecundación los ovocitos fueron sometidos a vortex durante 3 minutos en solución de hialuronidasa al 0,1%. Para determinar el porcentaje de ovocitos maduros fueron observados bajo una lupa estereoscópica con aumento de 40 x, aquellos en los que era posible visualizar el corpúsculo polar fueron considerados ovocitos maduros. Los ovocitos desnudos fueron lavados 3 veces en medio m-SOF adicionada de 10% de suero fetal bovino. El cultivo de embriones se realizó en una placa Falcon 1008 que contenía gotas de 50 μ l con monocapa de células de la granulosa como co-cultivo con m-SOF adicionada de 10% de suero fetal bovino, el cultivo se realizó en la estufa de cultivo con atmósfera húmeda de CO₂ de 5% al aire. La

evaluación del desarrollo de los embriones se realizó cada 48 horas para observar el número y estado de desarrollo de estos. El medio de cultivo fue reemplazado en un 50% cada 48 horas.

Para cumplir con el objetivo 4.

Actividad 4. Crioconservación de embriones desarrollada

Para congelar embriones ovinos se indujo superovulación de un grupo de ovejas:

Inducción de superovulación.

La inducción de superovulación se realizó luego de la sincronización con CIDR durante 12 días y la aplicación de 200 mg de FSH porcina (Folltropin-V®) como dosis total por animal administrada en un esquema decreciente con dos inyecciones diarias a partir del día 10 de la mantención del CIDR. A las donantes de embriones se les realizó servicio a tiempo fijo.

Recuperación de embriones mediante técnica quirúrgica.

A los 6-6,5 días del servicio los embriones se colectaron por técnica quirúrgica, previo ayuno total por 12-24 hs. Se realizó laparotomía paramediana previa tranquilización con acepromacina. Se exteriorizó cada uno de los cuernos uterinos y a unos 3-4 cm de su bifurcación se cateterizó con sonda Foley 8 Fr, tratando siempre de mantener húmeda la superficie de los cuernos con aspersión de solución salina con antibióticos sobre ellos. Por el extremo de la unión útero tubárica se inyectó 20 ml de medio de colecta PBS el cual se recogió copas especiales. Finalizado el lavado o flushing de ambos cuernos se enjuagó el tracto con suero fisiológico, suturando en dos planos se aplicó desinfectante y

cicatrizante sobre la herida. Además, se aplicó antibióticos amplio espectro.

Congelación de embriones ovinos

Los embriones fueron congelados mediante una técnica convencional usando una máquina automática para congelar basada en el uso de etanol.

Vitrificación de embriones

Bovinos. Embriones bovinos producidos in vitro fueron vitrificados, una técnica más moderna de congelación, barata y simple de realizar, que no necesita maquinas ni aparatos especiales.

Ovinos. Embriones ovinos, principalmente blastocistos, producidos in vitro también fueron vitrificados.

Vitrificación de ovocitos bovinos

Ovocitos bovinos madurados in vitro fueron vitrificados

Producción de embriones bovinos partenogenéticos

Ovocitos bovinos maduros vitrificados y descongelados fueron estimulados químicamente para producir embriones partenogenéticos.

Esta última es una técnica biotecnológica de punta que sirve para estudios de clonación y transgenesis.

Para cumplir con el objetivo 5.

Actividad 5

Centro Tecnológico de Reproducción

Pese a que el proyecto sólo consideraba formular un modelo de Centro Tecnológico de Reproducción de Ovinos de alta calidad, desde el comienzo del proyecto hubo actividades que deben desarrollarse en este tipo de centro.

Recepción y entrenamiento de animales

Las hembras se agruparon en el rebaño de “elite” y los machos fueron separados en pesebreras individuales; se les asignó un código.

El manejo de estos animales se realizó para lograr cumplir con las exigencias sanitarias impuestas por el SAG para la internación de semen ovino y caprino a Chile (Anexo 2)

Los carneros fueron entrenados al manejo de personas que los cuidan, alimentan y que trabajan con ellos. Acostumbrarlos a la vagina artificial fue un proceso largo y cuidadoso.

Recolección y manejo de semen

Se hizo recolección de semen con vagina artificial, se evaluó el semen; además se congeló semen en minitub, pajuela fina y pellet.

5. RESULTADOS

Tabla 3. Resultados por Hitos

Hito	Descripción	Fecha propuesta	Fecha cumplida
1	Técnica de punción folicular por aspiración laparoscópica validada	17/05/05	17/05/05
2	Obtención de blastocistos producto de aspiración folicular, maduración, FIV y cultivo	31/08/05	21/09/05
3	Tasa de FIV mejorada	18/04/06	05/03/08
4	Nacimiento crias producto de embriones producido in vitro	31/10/06	- - -
5	Cultivo de embriones desarrollado	06/02/07	04/03/08
6	Preñez producto de embriones in vitro congelados	31/08/07	17/10/07*
7	Modelo conceptual y de gestión operativa de un centro tecnológico de reproducción desarrollado	18/12/07	18/12/07
8	Resultados difundidos	24/01/08	11/02/07
9	Desarrollo de embriones producidos in vitro, vitrificados y cultivados in vitro	31/01/08	31/01/08
10	Crioconservación de embriones ovinos desarrollada	11/03/08	11/03/08

* Nacimiento de cordero producto de embrión congelado obtenido in vivo

HITO 1. Técnica de Punción folicular por aspiración laparoscópica validada

Durante el primer período de información (Informe N° 1 del 23 de Septiembre del 2005) se logró cumplir con el primer HITO, es decir la Técnica de punción folicular por aspiración laparoscópica quedó validada.

La técnica de punción folicular quedó absolutamente establecida, determinándose una duración de 15 minutos por oveja, con una frecuencia de 14 días por animal, una tasa de recuperación de 79,5% y un promedio de 4,6 COCs por oveja por sesión.

HITO 2. Obtención de blastocistos producto de aspiración folicular, maduración, FIV y cultivo de embriones in vitro

Este HITO se logró el 21 de Septiembre del 2005; en los días siguientes se realizó un ensayo con ovocitos obtenidos de ovarios provenientes de matadero. De 40 ovocitos obtenidos se logró una tasa de fecundación de 60% (2-8 células a las 48 horas de cultivo). Al séptimo día de cultivo 2 se logró dos blastocistos y un día más tarde otros dos blastocistos.

Estos cuatro blastocistos fueron vitrificados según el método descrito por Arteaga et al, 2004, y se encuentran almacenados congelados en un bidón de N líquido a menos 196 grados bajo cero.

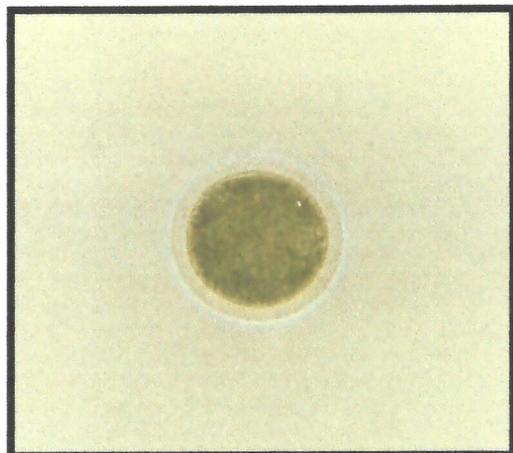
HITO 3. La tasa de FIV mejorada

La tasa de FIV mejorada se logró por mejoramiento de la tasa de maduración

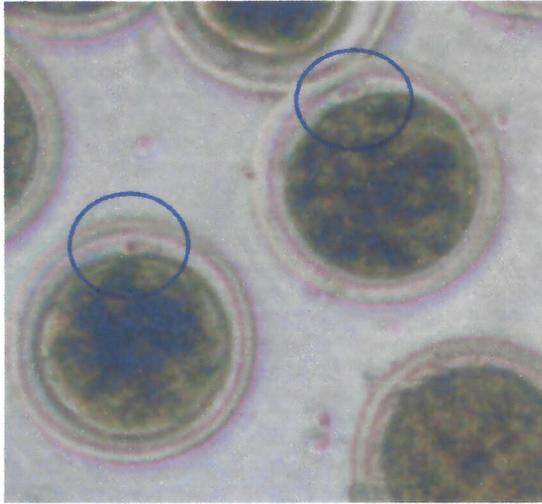
1.- Los índices de fecundación y desarrollo de embriones especialmente en bovinos alcanzaron un nivel que puede usarse en un número mayor de animales. En la última etapa del proyecto se obtuvo un avance extraordinario en el ovino.



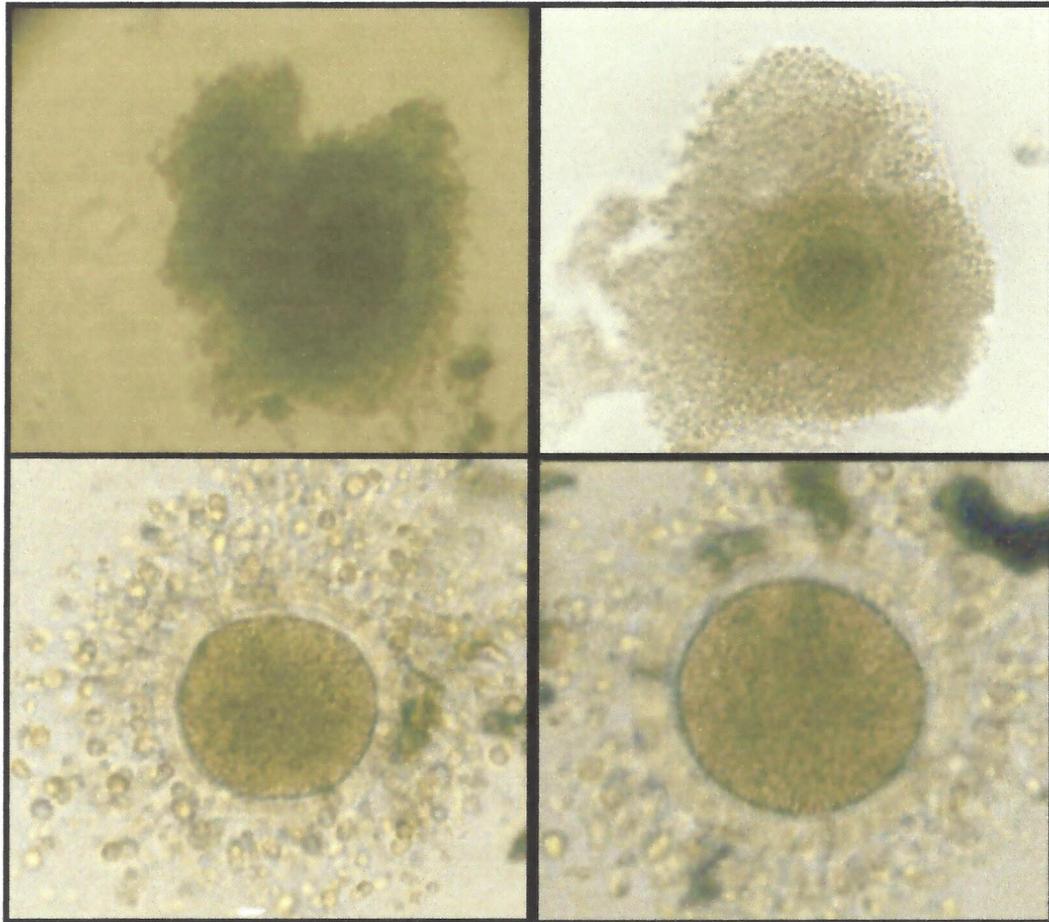
Visión ampliada
de un ovocito con características
morfológicas seleccionables



Visión ampliada
de un ovocito completamente
desnudo



ovocitos desnudos. En un círculo se ve el corpúsculo polar, signo de maduración ovocitaria.



HITO 3.

Tasa de FIV Mejorada

El trabajo de fecundación *in vitro* con ovocitos de ovejas fue más complicado de lo planteado porque el número de COCs obtenibles es muy bajo dado el pequeño número de ovejas disponibles. Mantener ovejas experimentales es muy caro y es necesario considerar además el carácter estacional de la reproducción ovina lo que reduce el tiempo usable a la temporada reproductiva que se desarrolla generalmente durante los meses de otoño. Dada estas razones, se decidió poner mayor énfasis en aumentar la tasa de fecundación *in vitro* y cultivo de embriones en el bovino, que estaban funcionando bajo en nuestro Instituto y que cuando el Centro Biotecnológico comience a funcionar será relativamente fácil adaptar y aplicar estas biotecnologías al ovino. Con los estudios realizados durante este período se logró aumentar la tasa de fecundación *in vitro* (bovino) a 65% sobre 1000 ovocitos maduros.

En el ovino, la tasa de fecundación fue bastante más baja, sin embargo, en los últimos ensayos hubo un notable aumento de la tasa de fecundación como se muestra en las tablas siguientes:

Tabla 4. Resultados de COC's procesados, segmentación y blástulas hasta días de cultivo *in vitro* por donante colectada con fecha 19/02/08.

8

N° de donante	COC's procesables	Tasa de segmentación	Tasa de blastocistos/COC's Colectados
752	2	0	0
711	2	0	0
718	3	0	0
703	5	2	0
728	3	1	0
727	3	1	0
736	4	2	0
Total	19	7(36.8%)	0 (0%)

Tabla 5. Resultados de COC's procesados, segmentación y blástulas hasta días de cultivo in vitro por donante colectada con fecha 20/02/08.

8

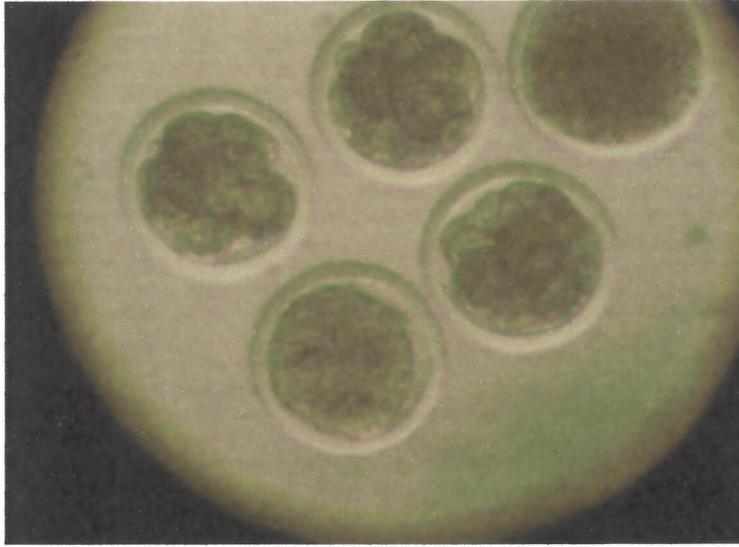
N° de donante	COC's procesables	Tasa de segmentación	Tasa de blastocistos/COC's Colectados
724	1	0	0
722	2	1	0
729	5	3	0
704	8	5	0
745	2	1	0
Total	18	10 (55.5%)	0 (0%)

Tabla 6. Resultados de COC's procesados, segmentación y blástulas hasta 8 días de cultivo in vitro por donante colectada con fecha 05/03/08.

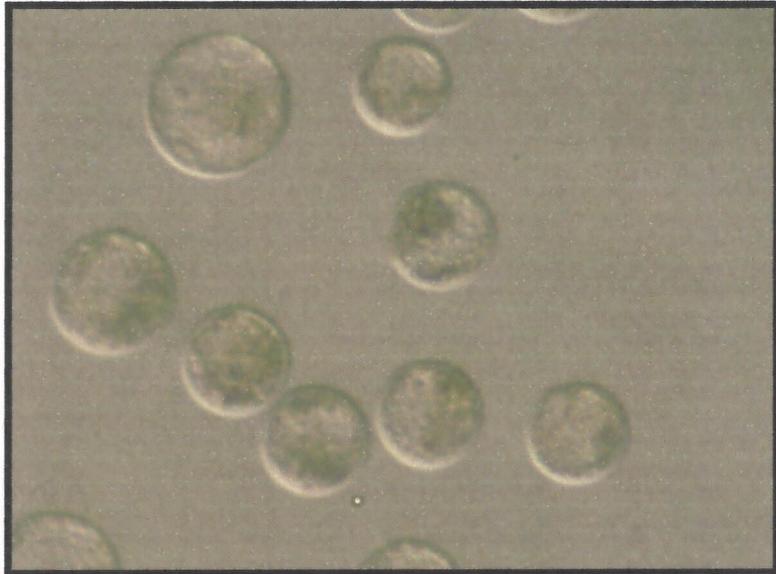
N° de donante	COC's procesables	Tasa de segmentación	Tasa de blastocistos/COC's Colectados
744	5	3	1
724	2	1	0
730	3	2	0
738	2	1	0
729	5	4	2
Total	17	11(64.7%)	3 (17.6%)

Tabla 7. Resultados de COC's procesados, segmentación y blástulas hasta días de cultivo in vitro por donante colectada con fecha 06/03/08.

N° de donante	COC's procesables	Tasa de segmentación	Tasa de blastocistos/COC's Colectados
702	6	4	2
750	3	1	0
749	6	4	3
756	5	4	2
701	0	0	0
Total	20	13(65%)	7 (35%)



Embriones ovinos tempranos obtenidos por FIV.



HITO 4

Transferencia de un embrión congelado.

Como una forma de evaluar nuestro sistema de congelación de los embriones, se realizó una transferencia de un embrión congelado. La receptora se colocó en la camilla a 45° con la cabeza hacia abajo. Previo a la transferencia a la receptora se le impuso un ayuno mínimo de 10 horas.

Diagnóstico de preñez.

A los 30 días se realizó diagnóstico de preñez mediante ecografía siendo positiva, confirmándose esta preñez mediante ecografía a los 60 días.

Nacimiento de cría de embrión congelado.

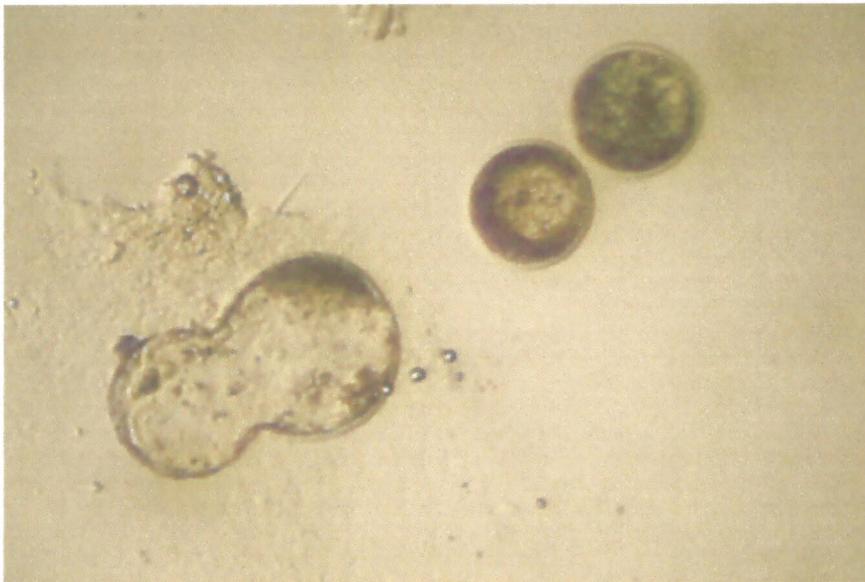
El día 17 de Octubre nació una hembra producto de la transferencia del embrión congelado como actividades planificadas de este proyecto. Lamentablemente dos días después falleció esta hembra.

No se intentó realizar mas transferencia de embriones dado lo caro y oneroso que es mantener un rebaño de ovejas receptoras; sin embargo, la tasa de sobrevivencia de 72% postdescongelamiento de embriones bovinos producidos in vitro que fueron vitrificados indican que el método de vitrificación usado permite una alta supervivencia a la congelación.

HITO 5

Cultivo de embriones desarrollado

En Tablas 6 y 7 puede observarse que el desarrollo de blastocistos ovinos subió a 17,6% y 35%. Aunque el número de ovocitos usados es pequeño se muestra un avance que se buscó desde el comienzo del proyecto. Si se pudiese extender estos experimentos hasta el fin de la estación reproductiva de la oveja habría sido interesante ratificar este resultado



blastocistos ovinos producidos in vitro, note como el más grande ha eclosionado

HITO 6

Preñez producto de embriones in vitro congelados

El nacimiento de un cordero producto de un embrión congelado que fue descongelado y transferido está dando señales que el método de congelación implementado es adecuado.

HITO 7

Modelo Conceptual y de gestión de operative de un Centro tecnológico de reproducción desarrollado

DESARROLLO DEL MODELO CONCEPTUAL DEL FUNCIONAMIENTO DEL CENTRO.

El modelo conceptual del Centro que se propone es de un centro de innovación tecnológica, asociado si es posible, a una universidad y puesto al servicio de criadores, productores e industriales pecuarios, para desarrollar y aplicar biotecnologías reproductivas que favorezcan la obtención de material genético de distintas razas ovinas, también podría incluirse razas bovinas, de interés comercial y alto valor genético tendiendo al establecimiento de certificación de calidad y trazabilidad de origen de embriones, semen, carnerillos y borregas.

Uno de sus objetivos principales será incorporar genética de alta calidad a los rebaños ovinos de las regiones VI a la X. También estará disponible para los productores de las regiones XI y XII si desean tener acceso a biotecnologías reproductivas desarrolladas en el Centro.

El Centro tratará de producir embriones, semen y carneros de valor genético que influyan en mejor calidad del producto y menores costos de producción. Además, podrá multiplicar en forma rápida y

económica los mejores individuos de razas dispersas en el país tratando de crear un banco de genoma nacional.

Dado el carácter universitario de este Centro, también favorecerá la formación de recursos humanos a nivel de perfeccionamiento de productores y técnicos y especialización de profesionales, magíster y doctorados.

Visión estratégica:

Usando la experiencia de países con ganadería avanzada hemos planteado la relación que podría tener este Centro con Núcleos Dispersos, Multiplicadores y Productores (Figura 1) donde se define como Núcleos Dispersos a aquellos establecimientos éliticos que tendrán y podrán distribuir material genético superior, desde el punto de vista productivo, Multiplicadores, productores más especializados y finalmente los productores comunes o pequeños agricultores.

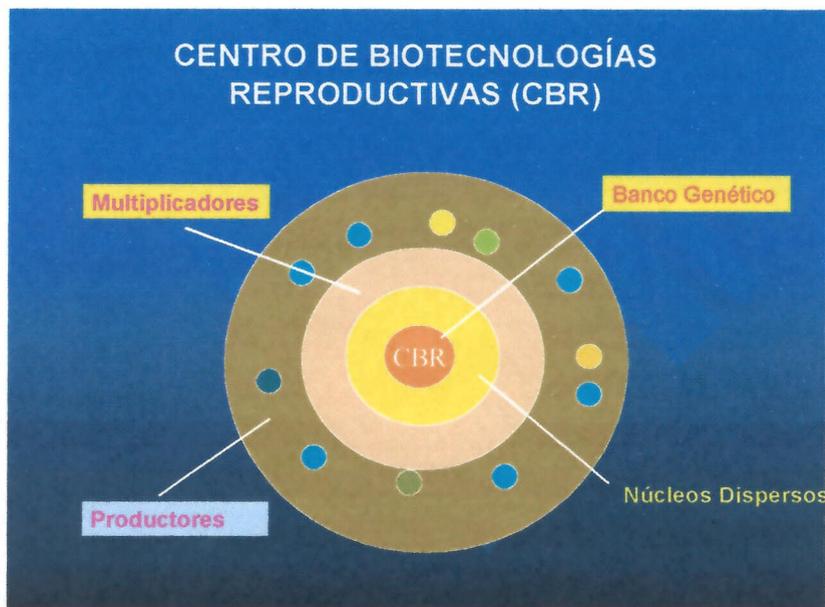


Figura 1. Relación del Centro de Biotecnologías Reproductivas (con un banco genético) estará relacionado con Núcleos Dispersos ubicados estratégicamente, Multiplicadores y Productores.



Figura 2

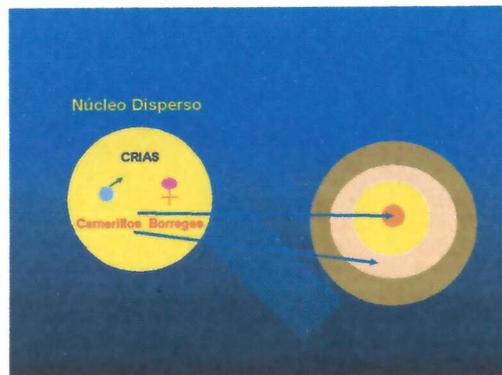


Figura 3

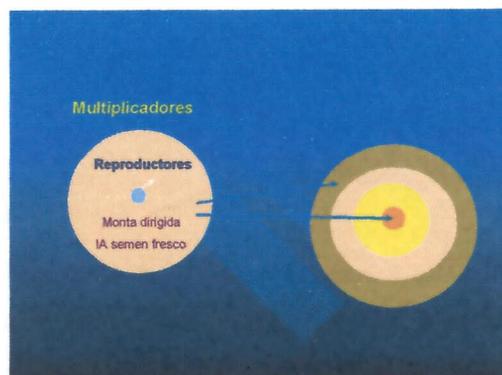
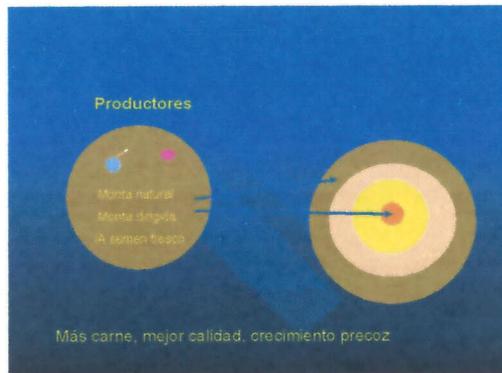


Figura 4



Figuras 5

En Figuras 2-5, se describen los productos de cada componente y su interrelación. Este esquema fue planteado por el coordinador de este proyecto en seminarios del rubro ovinos realizados en Loncoche y Osorno durante el año 2006.

Animales pertenecientes al Centro Tecnológico

Carnero Texel 051 (TX51)



- Volumen seminal: 1,5 ml
- Movimiento en masa: 4.5
- Movimiento progresivo: 85%
- Concentración espermática: 3.428.000.000 esp./ ml.

El semen de este carnero es utilizado en FIV

Carnero Texel 0 (TX0)



- Volumen seminal: 1.2 ml.
- Movimiento en masa: 4
- Movimiento progresivo: 83%
- Concentración espermática: 3.164.000.000 esp./ ml.

Coopworth (CP1)



- Volumen seminal: 1 ml.
- Movimiento en masa: 4
- Movimiento progresivo: 80%
- Concentración espermática: 3.246.000.000 esp./ ml.
- El semen de este carnero se utiliza para FIV

Milschaf (MS1)



- Volumen seminal: 1 ml.
- Movimiento en masa: 4
- Movimiento progresivo: 77%
- Concentración espermática: 2.284.000.000 esp./ ml.



Dohne Merino (MD1)



- Volumen seminal: 1.5 ml.
- Movimiento en masa: 5
- Movimiento progresivo: 85%
- Concentración espermática: 3.160.000.000 esp./ml.
- El semen de este carnero se utiliza para FIV



Ovejas Poll Dorset.



Ovejas Coopworth.

HITO 8

Resultados difundidos

Charlas sobre biotecnologías reproductivas se entregaron:

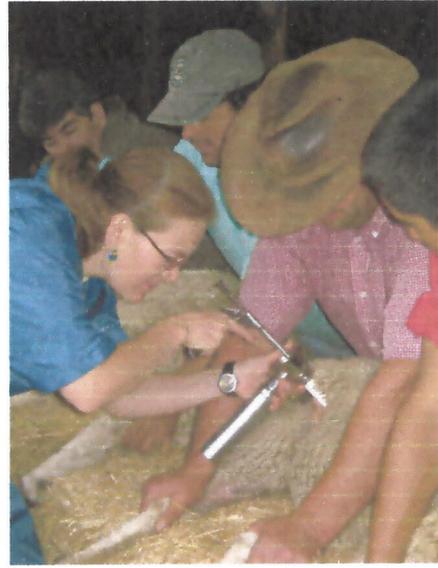
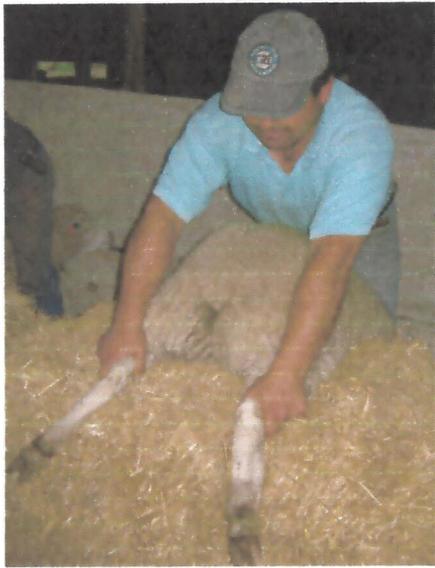
Tercer Seminario de Producción Ovina para productores de la Zona Sur, realizado en Loncoche

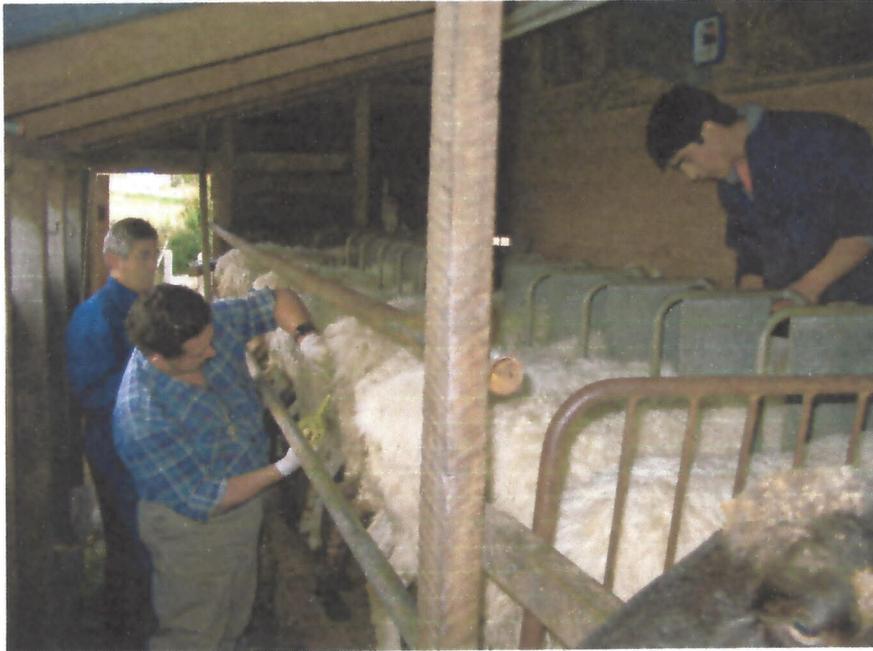
Segundo Seminario Ovino realizado en Osorno por Tattersall Remates

Programa de Diplomado de Mejoramiento Genético, Productivo y Reproductivo para profesionales y servidores de INDAP, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Se dio capacitación y entrenamiento en inseminación artificial y manejo de semen a los médicos veterinarios Rodrigo Correa y Juan Pablo Salazar de Tattersall, Osorno, y Marcelo Quezada (INIA, VI Región).

Se dio "servicio" de inseminación con semen congelado a Agrochiloé, una agrupación que reúne alrededor de 800 productores de Chiloé, a Rafael Maripan, pequeño productor de quesos de Chiloé durante dos temporadas; además se inseminó con semen fresco ovejas de un productor de Valdivia. También se ha dado apoyo al Programa Ovino de Carnes Tattersall de Osorno y hubo conversaciones para apoyar el Programa Ovino de la Municipalidad de Loncoche.





HITO 9

Desarrollo de embriones producidos in vitro, vitrificado y cultivados in vitro

Se logró 55,1% de supervivencia de ovocitos bovinos, desde el punto de vista morfológico, a la vitrificación. Inmediatamente después del descongelamiento se observó que los ovocitos se encontraban deshidratados con el citoplasma retraído, a medida que transcurrían los minutos recuperaron su forma esférica normal rehidratándose el citoplasma.

Esta supervivencia de los ovocitos a la vitrificación se expresó, desde el punto de vista fisiológico en la capacidad de división (Figura 3) en respuesta al estímulo de la activación química e incluso se logró la formación de blastocistos (Figura 4).

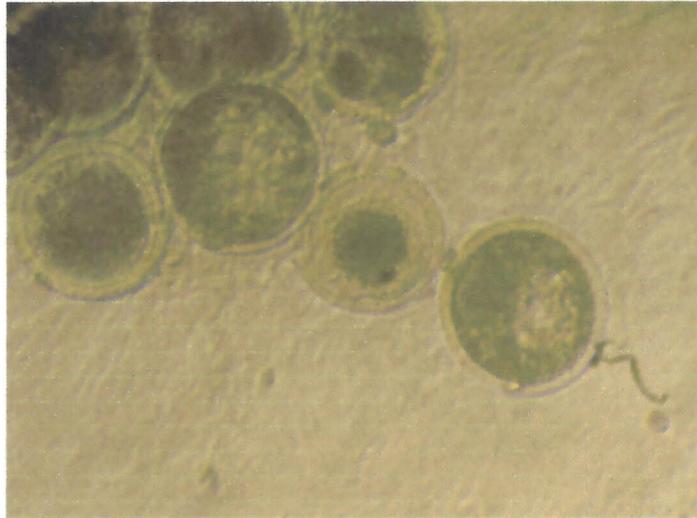


Figura 4. Blastocistos bovino a partir de ovocitos vitrificados
Bovine blastocysts obtained of vitrified oocytes

HITO 10

Crio conservación de embriones ovinos desarrollada

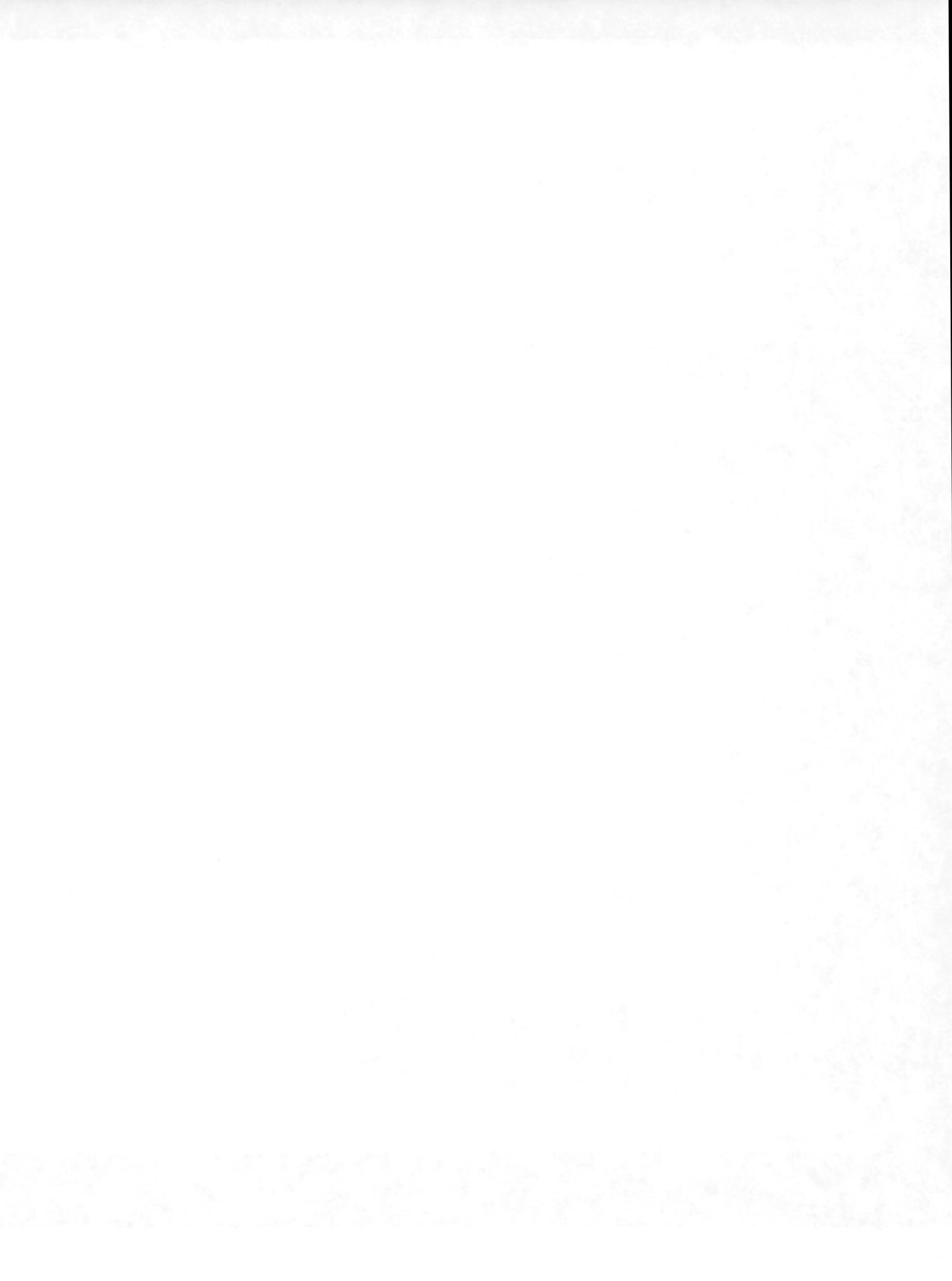
Congelación de embriones ovinos

Hasta el fin del proyecto se logró congelar 64 embriones, especialmente blastocistos de ovejas de razas especializadas en carne. Uno de estos embriones se descongeló y transfirió a una oveja receptora, lográndose preñez y parto de una cría como fue descrito en INFORME N° 3. Por lo tanto actualmente hay 63 embriones almacenados en N2 líquido de acuerdo al siguiente esquema:

IDENTIFICACIÓN EMBRIONES CRIOPRESERVADOS

PROYECTO FIA

Pajuela 1	2 Blastocitos	1	
Pajuela 2	2 Blastocitos	1	
Pajuela 3	2 Blastocitos	1	
Pajuela 4	2 Blastocitos	1 TXS/N	
Pajuela 5	1 Blastocito expandido	MD1619	se borró identificación
Pajuela 6	1 Blastocito temprano	MD1619	se borró identificación
Pajuela 09	1 Blastocito	1 SU 414	descongelado
Pajuela 10	2 Blastocitos	2 SU 414	
Pajuela 11	1 Blastocito expandido	1 SU 414	descongelado y
transferido 29/05/07			
Pajuela 12	1 mórula compacta	2 SU 414	
Pajuela 13	1 Blastocito	1 SU 445	
Pajuela 14	2 Mórulas compactas	2 SU 445	descongeladas
Pajuela 15	1 Blastocito	1 SU 445	
Pajuela 16	1 Mórula compacta	1 SU 445	
Pajuela 17	1 Blastocito	1 SU 445	
Pajuela 18	2 Blastocitos descongelados	SU 414 y 445	
Pajuela 19	1 Blastocito temprano	1 TX SN	
Pajuela 20	2 Blastocitos	1 TX SN	
Pajuela 21	2 Blastocitos	1 TX SN	
Pajuela 22	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1619	
Pajuela 23	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1619	
Pajuela 24	1 Blastocito temprano	1 MD 1619	
Pajuela 25	1 Blastocito	1 MD1618	
Pajuela 26	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1618	
Pajuela 27	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1618	
Pajuela 28	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1618	
Pajuela 29	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1618	
Pajuela 30	2 Blastocitos expandidos	1 MD 1618	



Pajuela 31 2 Blastocitos expandidos 1 MD 1618

Pajuela 32 2 Blastocitos expandidos 1 MD 1618

Pajuela 33 2 Blastocitos expandidos 1 MD 1618

Pajuela 34 2 Blastocitos expandidos 1 MD 1618

Pajuela 35 2 Blastocitos libres 1 MD1618

Pajuela 36 1 Blastocito 1 PD 541

Pajuela 37 1 Blastocito temprano 2 PD 541

Pajuela 38 1 Blastocito 2 PD 541

Pajuela 39 1 Blastocito 2 PD 37-3

Pajuela 40 1 Blastocito expandidos 1 MD 1618

Pajuela 41 1 Blastocitos expandidos 1 MD 1618

Pajuela 42 1 Blastocitos expandidos 2 MD 1618

Pajuela 43 1 Blastocitos 1 PD 541

Pajuela 44 1 Blastocitos 1 PD 541

Pajuela 45 1 Blastocitos 1 PD 541

Pajuela 46 1 Blastocitos expandidos 1 PD 541

Pajuela 47 1 Blastocitos expandidos 1 PD 541

Pajuela 48 1 Blastocitos expandidos 1 PD 541

Pajuela 49 1 Blastocitos expandidos 1 PD 541

TOTAL DE EMBRIONES CONGELADOS: 63

31 Dohne Merino, 7 Texel, 14 Suffolk y 11 Poll Dorset

El análisis de estos resultados revela que se ha logrado desarrollar por primera vez en Chile, gracias al apoyo financiero de FIA, un conjunto de biotecnologías reproductivas que pueden aplicarse separadamente o en conjunto en la especie ovina.

La inseminación artificial de ovejas con semen fresco se practica, especialmente en Magallanes desde la década de los 60. Con semen congelado también se insemina un número menor de ovejas en Magallanes; de hecho en Kampenaike se dicta un curso corto sobre manejo de semen e inseminación artificial en ovinos. En la Universidad Austral de Chile se hizo transferencia de embriones en ovejas por primera vez en 1971 y más tarde se han implantado embriones ovinos importados. En la Universidad de Concepción, Chillán, existen antecedentes que se habría hecho una tesis de pregrado en fecundación in vitro en ovinos.

Pese a estos antecedentes, se confirma que no existe un centro tecnológico donde puedan aplicarse el conjunto de las biotecnologías desarrolladas. La validación de la recuperación de ovocitos por laparoscopia, las tasas de maduración de COCS, fecundación y cultivo in vitro de embriones ovinos obtenidas, aunque sea en un pequeño número de COCs, dan una base sólida para intentar aplicarlos a mayor escala, ojalá en un centro tecnológico o lugar específico dedicado a estas actividades.

El establecimiento de la congelación, convencional y vitrificación, de embriones ovinos también es una innovación tecnológica para el país que puede tener una aplicación sustentable en la ganadería ovina.

Los estudios de vitrificación de COCs bovinos desarrollados, aunque no estaban considerados en los objetivos del proyecto, abren posibilidades inmensas a la conservación de material genético, como se usa en mujeres que padecen de cáncer ovárico, y al transporte de ovocitos a través de largas distancias. El cumplimiento de los objetivos

se logró con menos fondos de los presupuestados porque algunos cambios fuertes de reestructuración de la Facultad de Ciencias Veterinarias producidos el último año como fueron el retiro del personal participante del proyecto y la eliminación del Instituto de Reproducción Animal influyeron poderosamente en ser muy cuidadoso con los gastos; lo ideal habría sido poder confirmar especialmente los últimos ensayos de FIV y cultivo in vitro de embriones ovinos.

Conviene hacer notar que fue difícil el trabajo inicial puesto que los dos profesionales jóvenes, contratados a media jornada, tuvieron que aprender y entrenarse en técnicas como laparoscopia y técnicas de manejo de embriones. Además, la estacionalidad reproductiva del ovino disminuye notablemente la temporada de actividad folicular en estos animales. Las ovejas en anestro estacional tienen ovarios pequeños y con pocos folículos visibles que puedan ser puncionados. Por otro lado, el alto costo de los animales y su alimentación, el espacio físico disponible hizo que el número de ovejas experimentales fuese bajo disminuyendo las posibilidades de realizar este tipo de estudios en esta especie en el campus universitario en Valdivia.

Otro problema que hubo fue el cambio o reemplazo de profesionales durante el transcurso del proyecto; esto significó volver a empezar etapas de entrenamiento. Sin embargo, este problema que causó algún retraso en la obtención de ciertos hitos si se mira desde un punto positivo significa que el proyecto permitió que 4 profesionales asistentes que participaron en el proyecto hayan obtenido capacitación especializada en estos temas y hoy están en condiciones de participar en programas de apoyo a la ganadería, especialmente ovina, con estas nuevas biotecnologías reproductivas.

6. CONCLUSIONES

La punción folicular mediante laparoscopia quedó validada y la recuperación de 4,6 COCs por oveja abre posibilidades interesantes para esta especie puesto que en vacas la punción folicular mediante ultrasonografía da una cosecha de 5 COCs .

La tasa de fecundación in vitro en ovinos alcanzó un porcentaje de 65% en un pequeño ensayo (último) semejante al obtenido en bovinos como control. Esto significa que trabajando con un material más abundante como podría ser un centro dedicado a esto o un lugar en Magallanes donde hay mayor disponibilidad de ovejas y ovarios de matadero podría aplicar "industrialmente" esta biotecnología.

La producción in vitro de embriones ovinos alcanzó un porcentaje tan alto como 35%, porcentaje que necesita ser confirmado en un número mayor de COCs, podría esperarse que fuera posible obtener 1 a 2 embriones por sesión/oveja como se ha usado comercialmente por la empresa GNS en el bovino.

El establecimiento de la congelación de embriones ovinos quedó demostrado y permitió almacenar embriones en N2 líquido, descongelar un embrión, transferirlo y obtener una cría como ha ocurrido con embriones importados a Chile.

La vitrificación de embriones ovinos también quedó implementada, incluso fue posible guardar embriones ovinos vitrificados.

Los estudios de vitrificación de COCs bovinos demuestran que es posible almacenar este tipo de material genético.

La producción de embriones partenogénéticos bovinos producto de COCs que fueron vitrificados, es una biotecnología de punta e innovación tecnológica que demuestra que puede o debe haber un Centro dedicado a estudiar, desarrollar e implementar nuevas tecnologías que puedan aplicarse en el futuro a la ganadería ovina.

El trabajo en semen de carnero e inseminación artificial de ovejas puede ser incorporado como una actividad importante para el desarrollo de este Centro y su contribución a la ganadería ovina.

7. RECOMENDACIONES

Continuar con el apoyo por parte de FIA a este tipo de proyectos que favorezcan el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas.

Apoyar la implementación física de un Centro de Biotecnologías Reproductivas dedicado al ovino.

Sugerir a otras instituciones del Ministerio de Agricultura considerar al Centro de Biotecnologías Reproductivas como una herramienta potencial al desarrollo del ovino en general, a la industria de la carne ovina y a la agricultura familiar campesina en particular porque en Chile no existe un centro dedicado específicamente a estas biotecnologías reproductivas en el ovino.

El Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile está concentrado especialmente a la producción de semen bovino. CENEREMA, entidad formada gracias a la cooperación de los gobiernos de Chile y Japón se dedica a la difusión de la inseminación artificial para mejorar la productividad del ganado lechero de los pequeños productores. Sin embargo, ninguna de estas entidades trabajan el desarrollo biotecnológico de recuperación de ovocitos, maduración folicular, fecundación in vitro. Las universidades de Concepción y de la Frontera hacen estudios relacionados con fecundación in vitro básicamente en bovinos. INIA (Kampenaike) trabaja en inseminación artificial en ovinos. A nivel de empresas, GNS que estaba dedicada a la producción in vitro de embriones bovinos dejó de funcionar y Siagra, establecida en Freire, trabaja principalmente en la producción de semen bovino sexado y FIV para vacas de alta producción con problemas de fertilidad.

Anexo 1

**Trabajo científico de estudiante de Doctorado enviado a publicación en Revista
Archivos de Medicina Veterinaria**

**Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el estudio del desarrollo
partenogenético de embriones**

Vitrification of bovine oocytes and its use on the study of parthenogenetic development
of embryos

JA Ruiz^{1,2*}, JE Correa¹

¹Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad
Austral de Chile, Valdivia, Chile.

²Actualmente: Departamento Académico de Zootecnia, Facultad de Ciencias de
Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú.

SUMMARY

* Ciudad Universitaria Paturpampa, Huancavelica, Perú, fax: 51-67-451551; jaimeruiz@uach.cl,
jarube2801@gmail.com

The aim of this work was to vitrify bovine oocytes and to study its use in the production of parthenogenetic embryos. Oocytes were vitrified in a solution of vitrification with 35% ethylene glycol, 5% polyvinyl-pyrrolidone and 0,4M Thehalose. Vitrified/thawed oocytes (I, n = 76), exposed oocytes to cryoprotectants without vitrification (II, n = 119) and control oocytes (III, n = 142) were parthenogenetically activated by a 4-min exposure to 5 μ M Ca ionomycin at room temperature followed by a 5 hours incubation in 6-dimethylaminopurine at 38,5 °C in a 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ in humidified atmosphere. Embryos were cultivated on mSOF medium during 8-9 days. The rates of cleavage were 55,3%, 72,3% and 74,6%; and development to blastocysts were 7,1%, 17,4% and 21,7% with vitrified/thawed (I), exposed (II) and non-exposed (III) oocytes in the solution of vitrification respectively. These results demonstrate that is possible production of bovine parthenogenetic embryos from vitrified oocytes.

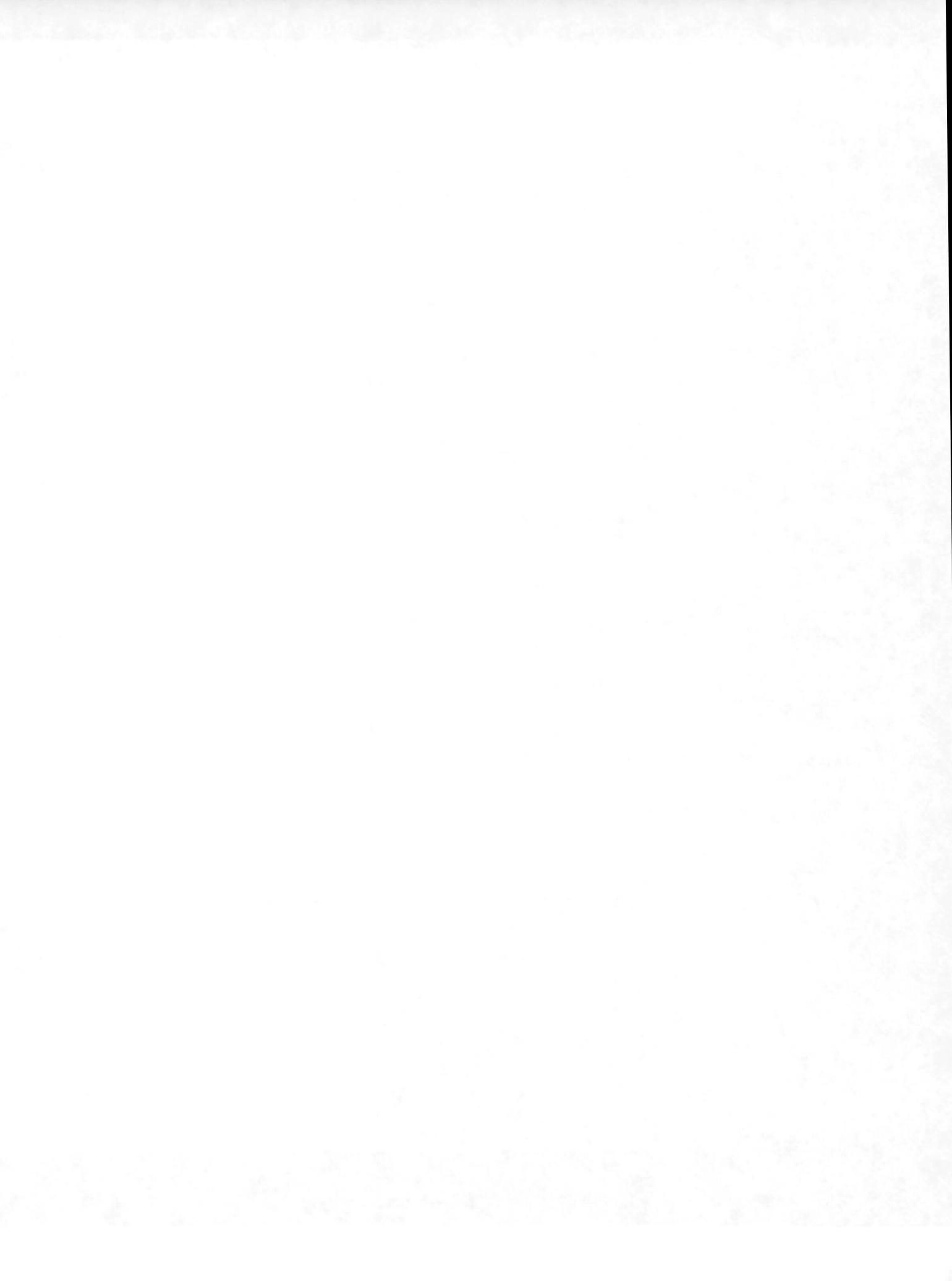
Key words: Vitrification, oocytes, parthenogenesis, bovines

INTRODUCCION

La vitrificación es una alternativa a los métodos convencionales de criopreservación. Es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones (Cando 2005). La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores con las células y el nitrógeno líquido (Rall y Fahy 1985). La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución a baja temperatura sin que ésta llegue a cristalizar debido a un enorme incremento de la viscosidad (Fahy 1986), manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación (Fahy y col 1984). La solución vitrificante utilizada posee crioprotectores en alta concentración que al ser enfriados no cristalizan, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de allí su nombre (Rall y Fahy 1985).

La estrategia de vitrificación es básicamente diferente a la estrategia de congelación tradicional. Una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas en la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre las células (Massip y col 1995, Dobrinsky 1996, Martino y col 1996). La vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo ya que al aumentar la velocidad de congelación disminuyen los daños causados por el enfriamiento pasando rápidamente por el rango de temperatura de mayor peligro entre +15 a -5 °C a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Dobrinsky 1996, Martino y col 1996, Isachenko y col 1998). Otra gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y puede ser realizada de manera muy sencilla (Cando 2005).

El interés en la criopreservación del ovocito ha aumentado con la creciente importancia en la producción de embriones *in vitro*, la transferencia nuclear y el almacenamiento de información en los bancos de genes (Dinnyés y col 2000). Por otro



lado el corto tiempo que un ovocito permanece viable y el limitado número de ovocitos que pueden ser colectados por día, hacen que el éxito de la criopreservación de ovocitos en mamíferos sea de gran interés para la investigación básica y la aplicación comercial (Albarracín y col 2005). De este modo, los ovocitos de algunas especies de mamíferos han sido atractivos para ser criopreservados a través de procedimientos de congelamiento lento o vitrificación, pero las tasas posteriores de fecundación y desarrollo son mucho más bajas que aquellas obtenidas usando ovocitos frescos (Albarracín y col 2005).

La activación partenogenética de ovocitos representa una herramienta válida para evaluar la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* y para la identificación de un protocolo óptimo para la activación del ovocito para el estudio del desarrollo embrionario *in vitro*, el estudio citogenético de embriones porque los cromosomas maternos resultantes pueden ser analizados independientemente de los cromosomas paternos (Varga y col 2008) y de tecnologías avanzadas tales como la clonación por transferencia nuclear (Gasparrini 2004).

En nuestro laboratorio se han producido con éxito embriones partenogenéticos con diferentes estímulos químicos y eléctricos (Gatica 2004 y González 2007). En el presente trabajo se pretende establecer la técnica de vitrificación de ovocitos bovinos y su eventual uso en la producción de embriones partenogenéticos mediante la activación química de estos ovocitos.

MATERIAL Y METODOS

Colección y maduración de complejo ovocito-cumulus

Complejos ovocito-cumulus (COCs) de ovarios de hembras bovinas faenadas en el matadero de Valdivia fueron recuperados y madurados *in vitro* de acuerdo al protocolo descrito por Martínez Díaz y col (2007). Brevemente folículos pequeños (2-7 mm) fueron aspirados con agujas 18 G y jeringas de 10ml en el laboratorio dentro de las 4 horas siguientes al sacrificio de los animales. El líquido folicular con los COCs recuperados se depositó en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) y mantenidos a 37°C donde se dejó decantar por 20 minutos. El sedimento fue aspirado con una pipeta Pasteur y se

depositó en placas Petri para ser diluído en medio oviductal sintético modificado suplementado con 25 mM Hepes (mSOF-HEPES, Takahashi y First 1992) y 1mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los COCs seleccionados bajo una lupa estereoscópica fueron madurados *in vitro* por 20-22 horas en estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO₂ al aire a 38,5°C en gotas de 50 µl (8-12 COCs/gota) de medio de cultivo de tejidos (TCM -199) con 25 mM de Hepes (Sigma) suplementado con piruvato de Na (Sigma) 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml (Sigma), FSH 0,02 unidades/ml (Sigma), estradiol 17-β (Sigma) 1µg/ml y suero fetal bovino (Sigma) al 10% (v/v). Después de la maduración, para separar los ovocitos de las células del cúmulus que los rodean, los COCs fueron sometidos a vórtex por 4 minutos en un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía solución de Fosfato Buffer Dulbecco (DPBS) adicionada de hialuronidasa (Sigma) al 0,1%. Los ovocitos fueron lavados al menos 2 veces en mSOF-HEPES y se seleccionaron los ovocitos que se encontraban en metafase II con un visible primer corpúsculo polar, considerados ovocitos maduros.

Vitrificación de ovocitos

Se desarrolló un procedimiento de vitrificación en superficie sólida basado en un método descrito por Atabay y col (2004). Los ovocitos maduros libres de células del cúmulus fueron suspendidos en un medio de equilibrio (SVI) consistente de 4% etilenglicol (EG, Sigma) diluído en una solución base (SB) compuesta por TCM-199 con 25mM de HEPES (Sigma) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Sigma) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Sigma) por 12-15 minutos sobre una platina temperada a 39°C. Luego, los ovocitos se colocaron en una solución de vitrificación (SVII) consistente de 35% EG, 5% de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) y 0,4M trehalosa (TRE, Sigma) en SB por 30 segundos. Inmediatamente, utilizando una micropipeta p10, microgotas de 3,5 µl de SVII conteniendo 4 - 6 ovocitos se dejaron caer sobre una superficie de papel de aluminio preenfriado flotando en nitrógeno líquido. Con ayuda de una pinza preenfriada las microgotas vitrificadas fueron transferidas hacia un vial criogénico de plástico de 2 ml preenfriado y fueron almacenadas en nitrógeno líquido durante 1-3 días hasta su uso.

Descongelamiento de ovocitos

Para descongelar los ovocitos, las microgotas vitrificadas se retiraron del vial criogénico y fueron expuestas a una solución de 2 ml de TRE 0,3M en SB por 5 minutos sobre una platina temperada a 39°C y luego los ovocitos fueron transferidos a SB por un tiempo no menor de 2 minutos. Los ovocitos se lavaron 3 veces en mSOF-HEPES y se colocaron en medio de maduración fresco por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, basado en una evaluación morfológica los ovocitos sobrevivientes a la criopreservación fueron seleccionados de acuerdo a la integridad de la zona pelúcida y presencia de un ooplasma homogéneo. Los ovocitos dañados por la solución de vitrificación fueron descartados.

Activación química de ovocitos

Se formaron 3 tratamientos experimentales de ovocitos expuestos a la activación química: I) ovocitos vitrificados sobrevivientes a la criopreservación, II) ovocitos expuestos a las soluciones vitrificantes (control de toxicidad de los crioprotectantes) y III) grupo control de ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes. Estos 3 grupos experimentales fueron activados de acuerdo al protocolo descrito por González (2007). Brevemente, los ovocitos fueron cultivados en mSOF-Hepes conteniendo 5 μ M de ionomicina de Ca (Sigma) por 4 minutos a 39°C e inmediatamente después cultivados en gotas de 100 μ l de mSOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA, 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, Sigma) y 12,5 μ M de citocalasina B (Sigma) por 5 horas en atmósfera húmeda con 5% CO₂ al aire a 38,5°C.

Cultivo in vitro de embriones

Concluidos los tratamientos para la activación artificial, los embriones fueron cultivados de acuerdo a Martínez Díaz y col (2007) por 8-9 días en gotas de 40 μ l de mSOF suplementado con 3 mg/ml de BSA en estufa de cultivo a 38,5 ° C en atmósfera húmeda de 5% de CO₂ al aire. Se evaluó la tasa de división celular a los 2 días y el número de blastocistos obtenidos a los 8 días de desarrollo post-activación química de los ovocitos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de división y de blastocistos en cada una de las réplicas evaluadas fueron expresados en porcentajes. Los resultados fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) después de la transformación arcsen de los datos. Se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios. Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.02 para windows (1999-2001 por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Desde el punto de vista morfológico, se logró 55,1% de supervivencia de ovocitos bovinos a la vitrificación. Inmediatamente después del descongelamiento se observó que los ovocitos se encontraban deshidratados con el citoplasma retraído (Figura 1), a medida que transcurrían los minutos recuperaron su forma esférica normal rehidratándose el citoplasma (Figura 2).

Esta supervivencia de los ovocitos a la vitrificación se expresó, desde el punto de vista fisiológico en la capacidad de división (Figura 3) en respuesta al estímulo de la activación química e incluso se logró la formación de blastocistos (Figura 4). Las tasas de división y de blastocistos de los 3 grupos experimentales se presentan en el Cuadro 1.

DISCUSION

La tasa de sobrevivencia (55,1%) de ovocitos bovinos vitrificados puede considerarse alta tomando en cuenta que es la primera vez que se aplica esta técnica en Chile. Esta supervivencia de ovocitos vitrificados podría ser aún más alta si se considera los resultados descritos por Dinnyes y col (2000) y Atabay y col (2004). Conviene hacer notar que la vitrificación es una técnica sencilla de ejecutar y que no requiere equipos sofisticados ni caros por lo que puede montarse fácilmente. Estos resultados abren además posibilidades de vitrificar ovocitos en lugares apartados y lejanos y de esta manera superar la limitante de la disponibilidad de ovocitos de especies exóticas como camélidos sudamericanos trasladando estos gametos desde distancias tan lejanas como Putre o Punta Arenas a laboratorios equipados convenientemente en otros lugares de Chile para la producción *in vitro* de embriones.

En el Cuadro 1 puede observarse que los crioprotectores usados no fueron tóxicos para los ovocitos bovinos dada la alta tasa de ovocitos morfológicamente normales (93,7%) alcanzado luego de la exposición a la solución de vitrificación. Además se logró 72,3% de segmentación y 17,4% de blastocistos con los ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectantes, no mostrando diferencias estadísticas con los ovocitos no expuestos del grupo control; esto quiere decir que la exposición de ovocitos bovinos a la solución de vitrificación no redujo la tasa de división y desarrollo de blastocistos partenogenéticos.

Además de la evaluación morfológica, pudo demostrarse que los ovocitos eran fisiológicamente viables post-descongelación, al ser capaces de segmentarse (55,3%) e incluso desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. Estos resultados han demostrado que es posible obtener ovocitos bovinos morfológicamente normales y fisiológicamente viables luego de la vitrificación. Asimismo estos resultados sugieren que pueden utilizarse ovocitos bovinos vitrificados para la producción *in vitro* de embriones por técnicas como fecundación o transferencia nuclear. Actualmente, está en progreso el estudio de vitrificación de ovocitos de otras especies.

AGRADECIMIENTOS

Parte de este trabajo fue financiado por el proyecto FIA PI-C-2004-1-P-047. Jaime Ruiz Béjar agradece a la Cooperación Técnico Belga del Perú por financiar su estadía en Chile.

REFERENCIAS

- Albarracín, J. 2005. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica de Open Pulled Straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos, y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*. *Tesis doctoral*, Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Albarracín J, R Morató, C Rojas, T Mogas. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertad and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 63, 890-901.

- Atabay EC, Y Takahashi, S Katagiri, M Pagano, A Koga, Y Kanai. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology* 61, 15-23.
- Cando JF. 2005. Evaluación de la sobrevivencia de embriones de coneja eclosionados, biopsiados y vitrificados por el método open pulled straw modificado. *Tesis de Magíster*, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- Dinnyés A, Y Dai, S Jiang, X Yang. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. 2000. *Biol Reprod* 63, 513-518.
- Dobrinsky JR. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45, 17-26.
- Fahy GM. 1986. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 224, 305 – 335.
- Fahy GD, D MacFarlane, C Angell, H Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.
- Gatica, C. 2004. Estudio de dos protocolos de activación y condiciones de cultivo sobre el desarrollo de embriones partenogénéticos bovinos. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile.
- Gasparriani B, L Boccia, A De Rosa, R Di Palo, G Campanile, L Zicarelli. 2004. Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-partenogenetic development. *Theriogenology* 62, 1627 – 1637.
- González PA. 2007. Desarrollo de embriones bovinos partenogénéticos y fecundados in vitro cultivados in vitro e in vivo en oviducto de coneja. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile.
- Isachenko V, C Soler, E Isachenko, F Perez-Sanchez, V Grishchenko. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipids droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36, 250-253.
- Martínez Díaz M, R Gatica, JE Correa, W Eyestone. 2007. Gestaciones producidas con embriones bovinos clonados por transferencia nuclear. *Arch Med Vet* 39, 59-62.
- Martino, A, N Songsasen, SP Leibo. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54, 1059-1069.
- Massip A, P Mermillod, A Dinnyes. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: Implications for their cryopreservation. *Hum Reprod* 10, 3004- 3011.

Rall WF, GM Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313 (6003), 573-575.

Takahashi Y, NL First. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucosa, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978.

Varga, E, R Pataki, Z Lorincz, J Koltai, A Bali Papp. 2008. Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemicals agents. *Anim Reprod Sci* 105, 226-233.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue vitrificar ovocitos bovinos y estudiar su uso en la producción de embriones partenogénéticos. Los ovocitos fueron vitrificados en una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol, 5% de polivinilpirrolidona y 0,4 M de Trehalosa. Ovocitos vitrificados/descongelados (I, n = 76), ovocitos expuestos a crioprotectantes sin vitrificación (II, n = 119) y ovocitos control (III, n = 142) fueron activados partenogénicamente por exposición de 4 minutos a 5 μ M de ionomicina de Ca a temperatura ambiente seguido de una incubación por 5 horas en 6-dimetilaminopurina a 38,5 °C en una atmósfera húmeda con 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂. Los embriones fueron cultivados en medio mSOF durante 8-9 días. Las tasas de división fueron 55,3%, 72,3% y 74,6%; y de desarrollo hasta blastocitos fueron 7,1%, 17,4% y 21,7% con ovocitos vitrificados/descongelados (I), expuestos (II) y no expuestos (III) en la solución vitrificante respectivamente. Estos resultados demuestran que es posible producir embriones partenogénéticos bovinos utilizando ovocitos vitrificados.

Palabras clave: vitrificación, ovocitos, partenogénesis, bovinos

Cuadro 1: Desarrollo partenogénico de ovocitos bovinos vitrificados, expuestos y no expuestos a una solución vitrificante.

Parthenogenetic development of vitrified, exposed and non-exposed bovine oocytes on the vitrification solution.

Ovocitos	Nº	Sobrevivientes	Activados	División	
Blastocistos		Post-vitrificación	(Réplicas)	2 días	8
días		ó post-exposición		(%) *	
(%) *					
Vitrificados	138	76 (55,1%)	76 (7)	42 (55,3) ^b	3
(7,1) ^b					
Expuestos	127	119 (93,7%)	119 (7)	86 (72,3) ^a	15
(17,4) ^{a,b}					
No expuestos	142		142 (7)	106 (74,6) ^a	23
(21,7) ^a					

* Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas (P < 0,05).

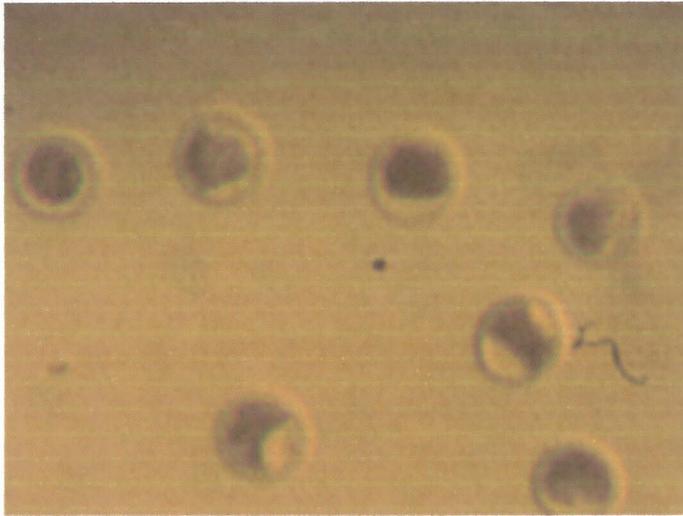


Figura 1. Ovocitos vitrificados inmediatamente después de la descongelación
Vitrified oocytes immediately after thawing

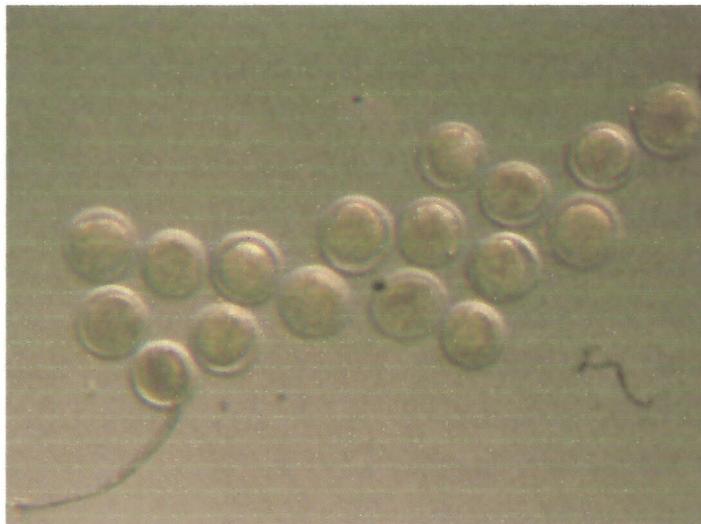


Figura 2. Ovocitos vitrificados listos para la activación química
Vitrified oocytes previous to chemical activation

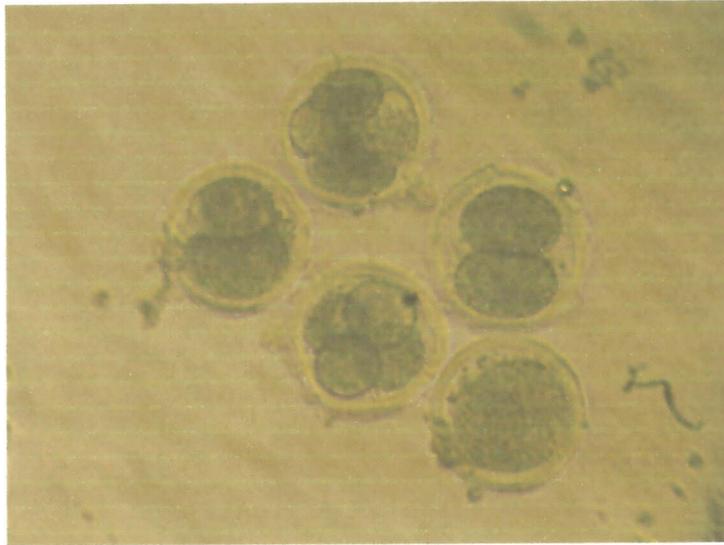


Figura 3. Ovocitos vitrificados divididos a los 2 días después la activación química
Cleaved vitrified oocytes to 2 days after chemical activation

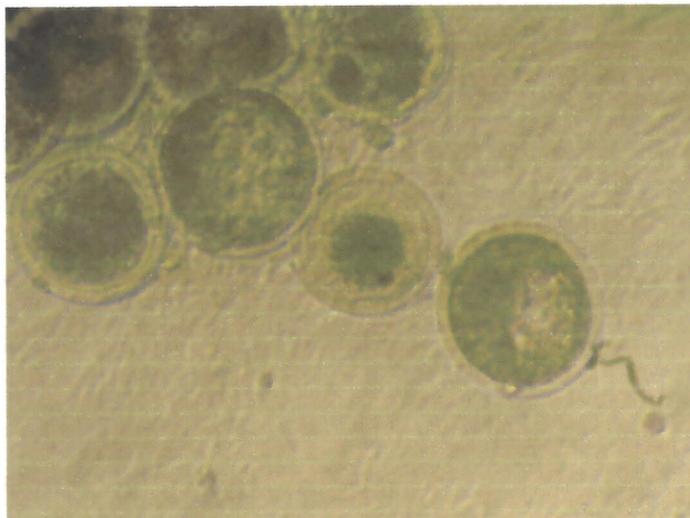


Figura 4. Blastocistos bovino a partir de ovocitos vitrificados
Bovine blastocysts obtained of vitrified oocytes

ANEXO 2

Regulación sanitaria para animales y gametos



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
SAG

Se3 y 4

FIJA EXIGENCIAS SANITARIAS PARA LA INTERNACION DE SEMEN OVINO Y CAPRINO A CHILE

SANTIAGO, 10 DE ENERO 2001

Nº. 35 EXENTA / VISTOS: Las facultades conferidas por la Ley Nro. 18755, el artículo 3ro. del DFL RRA. Nro. 16, de 1963, que, para la internación de animales y productos pecuarios, dispone cumplir las exigencias de orden sanitario que se especifique en cada caso, la Resolución N° 3138 de 26 de octubre de 1999 del departamento de Protección Pecuaria; y la Ley Nro. 18.164;

RESUELVO:

Artículo 1º: Fíjense las siguientes exigencias sanitarias para internar, a Chile, semen ovino o caprino.

El semen ovino o caprino que se importe al país, debe provenir de centros habilitados y venir premunido de un certificado oficial, emitido por la autoridad sanitaria competente, que estipule lo siguiente:

I. IDENTIFICACION DE LA PARTIDA DE SEMEN.

- A. Nombre y dirección del Centro de Inseminación Artificial.
- B. Identificación del o los donantes.
- C. Fecha de ingreso del donador(es) al Centro.
- D. Número de registro del donador(es)
- E. Fecha de recolección del semen.

F. Número de dosis por cada donador.

G. Identificación de pajuelas, tubos o ampollas de semen.

H. Unidades de embalaje.

II. CERTIFICACION SANITARIA.

1. DEL PAIS

El país o la zona de procedencia están declarados oficialmente libres de Fiebre Aftosa sin vacunación Peste Bovina, Viruela Ovina y Caprina, Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (sólo caprinos), Peste de Pequeños Rumiantes y Lengua Azul.

2. DEL CENTRO DE INSEMINACION ARTIFICIAL.

2.1 Es un Centro habilitado por personal del SAG para exportar a Chile, habilitación que puede ser delegada en la autoridad sanitaria competente del país de procedencia.

2.2 El Centro funciona bajo la supervisión oficial y bajo la dirección de un Médico Veterinario empleado por el Centro.

2.3 El Centro está físicamente aislado de otros establecimientos ganaderos.

2.4 El personal que labora en el Centro es de dedicación exclusiva.

2.5 El Centro mantiene un registro diario de salud de todos los animales residentes.

3.- DE LA ADMISIÓN DE LOS ANIMALES

3.1 Los animales que ingresan al Centro deben proceder de rebaños que no han estado sometidos a restricciones sanitarias por alguna de las siguientes enfermedades:

- Agalaxia Contagiosa, por lo menos desde hace 6 meses

- Linfadenitis Caseosa y Brucella ovis, por lo menos 12 meses
- Para TBC, por lo menos 2 años
- Scrapie, Adenomatosis pulmonar, Maedi-Visna y CAE, 3 años por lo menos.

3.2 El Centro sólo permite el ingreso de reproductores que han sido sometidos a una cuarentena de pre-entrada de a lo menos 30 días, durante la cual los animales fueron sometidos con resultados negativos al menos a las siguientes las pruebas:

- Brucella melitensis y Brucella ovis
- Maedi-Visna y CAE
- Lengua azul
- Enfermedad de Border
- Tuberculosis (sólo caprinos)
- Enfermedad de Johne
- Agalaxia Contagiosa
- Aborto Enzoótico

3.3 Al salir de la cuarentena para ingresar al centro de inseminación, los animales no presentaron ningún signo clínico de enfermedad y no haberse presentado brotes de enfermedades de denuncia obligatoria que afecten a la especie en un radio de 10 Km., de la estación Cuarentenaria.

4. LOS ANIMALES RESIDENTES EN EL CENTRO DE INSEMINACION.

4.1 Los animales residentes en el Centro han sido sometidos a inspección permanente de salud por el Médico Veterinario, poseen el estado sanitario exigido y en ellos no se han constatado signos clínicos de enfermedades infecto contagiosas, calificadas en la lista B de la OIE, durante un período de 6 meses anteriores a la primera recolección con destino a Chile y 40 días posteriores a la última.

4.2 Todos los animales residentes son sometidos a lo menos 2 veces al año, con resultado negativo, a las siguientes pruebas diagnósticas:

- Brucella melitensis
- Brucella ovis
- Maedi-Visna y CAE

- Lengua Azul

4.3 Las pruebas diagnósticas deben realizarse en laboratorios oficiales o reconocidos oficialmente y ellas no se exigirán si el país de procedencia está libre de la enfermedad correspondiente, debiendo acreditarse esta condición.

5. DEL DONANTE.

Ha sido mantenido como residente en el Centro por lo menos 30 días antes y 30 días después de la recolección de semen con destino a Chile, no ha presentado signos clínicos de enfermedad y no ha sido usado en monta natural,

6. DEL SEMEN.

6.1 La recolección, tratamiento, acondicionamiento y almacenamiento del semen se efectúan sólo en los locales previstos para este fin y utilizando material lavado, desinfectado y esterilizado.

6.2 Sólo se procesa semen recolectado en el mismo centro.

6.3 La dilución del semen se produjo con diluyentes libres de organismos patógenos.

6.4 Sólo frascos esterilizados y nitrógeno fresco no usado para ningún otro propósito ha sido utilizado para el almacenamiento.

7.- Derogase las Resoluciones 2096 de 31 de agosto de 1994, 3210 de 13 de diciembre de 1994, 1261 de 7 de mayo de 1996 y 3398 de 20 de octubre de 1998.

ANOTESE, TRANSCRIBASE Y PUBLIQUESE

LORENZO CABALLERO URZUA

DIRECTOR NACIONAL

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO

DISTRIBUCION :

- Dirección Nacional

- Departamento Protección Pecuaria:

- Direccion