

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE EMBRIONES DE CONEJO EN CULTIVO
EN ESTUFA Y BAÑO MARÍA**

Memoria de título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO.

ROSSANA ISABEL AMPARO HIDALGO CAMPOS

VALDIVIA- CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Renato Gatica G.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Rafael Burgos A.

Dr. Orlando Garrido

FECHA DE APROBACION

06 de Enero 2006.

A mis padres Bruno y Gloria....

INDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	13
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSINES	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27
9. ANEXOS	31
10. AGRADECIMIENTOS	37

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar dos métodos de cultivo *in vitro* (baño María y estufa), para embriones de conejo en estado de mórula, obtenidos de hembras superovuladas con Extracto Hipofisiario Equino (EHE) y de hembras no superovuladas. Ocho conejas mestizas adultas fueron distribuidas en dos grupos de 4 conejas cada uno. Las conejas del primer grupo fueron superovuladas con (EHE), con una dosis de 2,5 mg/kg, vía subcutánea, cada 12 horas y durante dos días. A las 24 horas de terminado el tratamiento, se realizó detección de celo. Las conejas del segundo grupo (o grupo control) fueron cubiertas sin tratamiento. Para ambos grupos se aceptó como signo positivo de celo, la presentación de turgencia y coloración rojo-púrpura de la vulva, junto con la aceptación del macho. Cuarenta y ocho horas posterior a la última cópula, se procedió al sacrificio de las hembras y a la extracción del tracto reproductivo. Se efectuó lavado de cada oviducto con 20 ml de solución PBS con 5 % de suero bovino.

Del grupo de conejas superovuladas se obtuvo un promedio de 29,5 ova fecundadas (mórula), más 1,25 ova no fecundadas. En el grupo control sólo se obtuvo ova fecundada, con un promedio de 8,5 por hembra. Los embriones obtenidos en estado de mórula fueron separados en dos grupos similares, para ser llevados a cultivos *in vitro*, en forma paralela, tanto en estufa al 5% de CO₂, utilizando placas Petri como a baño María con uso de tubos de vidrio. En ambos cultivos se utilizó medio TCM 199, y fueron mantenidos a una temperatura de 38,5°C por 72 horas. El análisis de los resultados consideró sólo los embriones que se desarrollaron hasta el estado de blastocisto.

En el grupo control, para el cultivo en baño María se obtuvo un 29,4% de desarrollo y un 88,2% de desarrollo para los de estufa, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). En el grupo de las hembras superovuladas se obtuvo un 0% de desarrollo para el cultivo en baño María y un 80% de desarrollo en cultivo en estufa. Por lo tanto, el desarrollo en cultivo *in vitro* para los embriones del grupo control fue mayor en ambos métodos con respecto al grupo de hembras superovuladas, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Se puede concluir que el EHE logra superovulación en conejas de forma satisfactoria, pero sus embriones presentan un menor porcentaje de desarrollo en cultivos *in vitro*, con respecto a los embriones obtenidos de hembras no tratadas. En el cultivo a baño María, la ausencia de aire y la densidad de embriones en el tubo fue un factor crítico para el desarrollo de los embriones, por lo tanto, este método, si bien es más fácil y económico de realizar, no demostró ser efectivo para el desarrollo embrionario.

Palabras clave: Extracto Hipofisiario Equino (EHE); cultivo de embriones; conejo.

2. SUMMARY

EVALUATION OF RABBIT EMBRYOS DEVELOPMENT IN WATER BATH AND INCUBATOR CULTURE

The aim of this work was compare to methods of culture *in vitro* (water bath and incubator) of rabbit embryos in a morulae stage, obtained of female superovulated with horse anterior pituitary (hap) and female non superovulated. eight females half-bred rabbits, adult, was distributed into two group of 4 rabbit. The female rabbits of the first group were superovulated with EHE, applying a dose of 2.5 mg/bw. in a subcutaneous way every 12 hours for two days. After 24 hours when the treatment was finished the heat detection was done in these female. The rabbit female of second group (control group) were mating without treatment. To both groups of rabbit it was accepted as a positive heat sing when they showed a vulve in a turgency state a purple-red color with the acceptance of male. After 48 hours they were sloughed and the extraction of the reproductive tract took place. Made washing the oviducts with 20 ml. of PBS (Plus 5% of bovine serum) each of them.

Of the groups the rabbit superovulate were get 29.5 fecunded ova as mean (morulae) more 1.25 non fecunded ova as mean. In the control group only 8.5 fecunded ova as mean was obtained.

The embryos get in morulae stage was separated in two culture groups, the culture was carried out in parallel way; in Petri dish in incubator with 5% CO₂ and water bath with glass tubes. Inboth cultures it was use TCM 199 and were maintained at 38,5°C during 72 hours. In the analysis of the results analysis were considered only embryos developed to blastocyst stage.

The control group cultured in incubator obtain 29% of development and the control group cultured in incubator obtain 88.2% of development; this difference is statistically significative ($p < 0.05$). In the superovulate females group it was obtain 0% of development to water bath culture embryos and 80% of development to incubator culture embryos. Therefore the development of *in vitro* cultured embryos of control group was greater in both methods in relation to the superovulated females groups, this difference is statistically significative ($p < 0.05$).

We can concluded that HAP achieves superovulation in rabbits females in a satisfactory way, but their embryos show a lesser percentage of development in *in vitro* culture, in relation to embryos obtain of control group females. In the bath water culture the absence of oxygen and the embryos density in glassy tube was a critical factor to the embryo development, therefore although this method is easier and more economical to do; it did not prove to be effective for the development of embryos.

Key Words: Horse Anterior pituitary, cultivation of embryos, rabbit.

3. INTRODUCCION

El cultivo de los embriones preimplantados ha sido desarrollado, modificado y perfeccionado por muchos científicos con el propósito de llevar a cabo estudios relacionados con técnicas de transferencia de embriones, estudios de fertilidad, gestación, desarrollo genético, diferenciación celular y preservación de embriones (Kraemer y col 1996).

El desarrollo de las metodologías de cultivo embrionario ha sido un proceso lento, el cual no ha estado exento de fracasos y dificultades, sin embargo en las últimas décadas se han alcanzado importantes progresos a nivel de tasas de desarrollo, como consecuencia del aumento en el conocimiento sobre el metabolismo y los requerimientos de los embriones en estadios preimplantacionales (Silva 2001).

Adams (1982) señala que Lewis y Gregory en 1929 cultivaron embriones de conejo desde los primeros estadios hasta el estado de blastocisto y que Pincus y Enzmann en 1934 fueron los primeros en obtener dos crías de conejas, de cinco embriones de una célula, cultivados *in vitro*, los cuales fueron puestos en frascos (carrel flasks) por 20 horas, para luego ser transferidos a una hembra pseudopreñada.

Gatica 1988 cultivó embriones de ovinos utilizando como medio de cultivo PBS suplementado con 15% de suero sanguíneo. Los embriones fueron puestos en pequeños tubos cubiertos con 5ml de medio en baño María a 37° C durante 24 a 48 hrs. Las observaciones realizadas durante este experimento aportan la base para el trabajo realizado en esta tesis.

3.1 CICLO ESTRAL

El conocimiento de la fisiología reproductiva de las hembras, especialmente los aspectos relacionados con el estro y el ciclo estral, ha conducido a la manipulación, control y sincronización de estro, siendo posible inducir ovulación e incluso superovulación (Britton 1988).

En la pubertad la hembra empieza a manifestar cambios en su conducta sexual (receptividad sexual), denominada celo o estro. Estos acontecimientos cíclicos repetidos que comienzan en un celo y finalizan en el celo siguiente reciben el nombre de ciclo estral (González 2004).

La coneja doméstica, *Oryctologus cuniculus*, pertenece al orden *Lagomorpha* y presenta diferencias fisiológicas y anatómicas con respecto a otras especies de interés zootécnico, especialmente interesantes a nivel de sistema reproductor (De Blas y Nuria 2001).

El ciclo estral de la coneja no es regular y tampoco definido (May y Simpson 1975; Alvaríño 1993, De Blas y Nuria 2001). Su ovulación no es espontánea, sino inducida por estímulo del coito, razón por la cual se discute sobre el carácter cíclico de la actividad ovárica (Tsiligianni y col 2004).

La coneja comienza el período prepuberal hacia las 10 semanas de vida, observándose las primeras oleadas de maduración folicular entre los 65 y 90 días de edad. No obstante, un desarrollo folicular pleno se alcanza cuando la coneja tiene entre 17 y 20 semanas de edad (De Blas y Nuria 2001).

Este desarrollo de folículos ocurre normalmente en oleadas, con 5 a 10 folículos en cada ovario con un ovocito en su interior cada uno. Los folículos producen estrógenos durante 12 a 14 días. Los folículos maduros tienen un rango de vida de 7 a 10 días, y al no producirse la ovulación los folículos maduros se atresian siendo reabsorbidos en el ovario, así los nuevos folículos son constantemente madurados (Adams 1982, Alvaríño 1993).

May y Simpson (1975) y Ruiz (1983) señalaron que las hembras pueden ser receptivas a los machos por periodos cortos con intervalos de 7 días o múltiplos de él, aún durante la preñez, pero especialmente a intervalos de 14 días, concluyendo así que el conejo doméstico tiene un ciclo estral corto.

Más tarde se ha señalado también la existencia de ciclos de maduración folicular de una duración estimada de 10 a 12 días y con una superposición de 6 días entre un ciclo y el precedente. Por consiguiente podríamos decir que la coneja tiene un ciclo de 16 a 18 días, de los cuales de 12 a 14 días está receptiva y los 4 restantes no acepta al macho (Alvaríño 1993).

Las manifestaciones externas de celo en la coneja son discretas y variables, excepto en la coloración de la vulva, que permite predecir el comportamiento frente al macho con relativa precisión, la vulva se acrecienta bajo los efectos del estrógeno evidenciando así una vulva de color rojo-púrpura, en presencia de la cual se logra la máxima aceptación del macho (97,5%), mientras que la mínima se alcanza para las vulvas de coloración blanca (20,6%) (Tsiligianni y col 2004).

El estado de turgencia de la vulva también es favorable para la cubrición, aumentando el porcentaje de receptividad de la hembra al macho (Ruiz 1983, Alvaríño 1993).

3.2 SUPEROVULACIÓN

El desarrollo de métodos para inducir superovulación en momentos predeterminados se ha convertido en objeto de interés y estudio, así como de grandes inversiones. En animales domésticos se han utilizado diferentes tratamientos hormonales, basados en el principio de estímulos, un desarrollo folicular múltiple, en el ciclo natural o inducido (Salas 1984).

Sin embargo, el objetivo de muchos estudios ha sido desarrollar un procedimiento estándar para inducir a la superovulación y determinar la hormona óptima, así como establecer los valores máximos de respuesta ovulatoria y máxima recolección (Tsiligianni y col 2004).

La superovulación consiste en inducir en forma artificial la liberación de un mayor número de ovocitos que el número natural y característico para cada especie, administrando gonadotropinas exógenas que induzcan el crecimiento folicular múltiple y que tengan actividad similar a hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Este objetivo se ha logrado mediante la administración en cantidades que superan el nivel endógeno normal (Letelier 1997, Stockebrand 2003).

Todas aquellas hormonas o preparados hormonales que se designan con el nombre de gonadotrofinas tienen como órgano blanco a las gónadas. A través de tratamientos con estas hormonas se puede inducir superovulación de hembras (Britton 1988).

Se ha indicado que las gonadotrofinas estimularían la actividad mitótica en folículos preantrales y antrales pequeños o que actuarían previniendo o invirtiendo el proceso natural de atresia (Araya 1995).

Las gonadotrofinas exógenas pueden tener estos dos orígenes, hipofisiario y extrahipofisiario o placentario (Carruthers 1986).

Las gonadotrofinas hipofisiarias son la FSH y LH, ambas son producidas en la adenohipófisis por distintos tipos de células cromófilas basófilas. También se incluye en este grupo a la hormona luteotrófica (LTH) o prolactina, hormona proteica producida por las células cromófilas acidófilas de la adenohipófisis. Entre las gonadotropinas extrahipofisiarias, llamadas también hormonas de la preñez, se incluyen la gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG) también llamada gonadotrofina coriónica equina (eCG), la gonadotrofina coriónica humana (HCG), la gonadotrofina de la preñez del bovino (BPG), el lactógeno placentario humano (HPL), y gonadotrofina menopausica humana (HMG) (Araya 1995).

Las gonadotrofinas, ya sean hipofisiaria o placentarias, son efectivas únicamente por vía parenteral. Son un grupo de hormonas glicoproteicas constituidas por dos fracciones, alfa y beta. La unidad alfa es casi idéntica en todas las gonadotrofinas, la diferencia entre ellas está en la unidad beta. La permanencia de la gonadotrofina en el organismo, tanto de la endógena como de la inyectada, está determinada principalmente por la degradación en el organismo, porque son escasamente excretadas por la orina, a excepción de la HCG, que tiene una vida media 11 a 23 horas. Estudios sobre la desaparición de las gonadotropinas endógenas en el organismo humano indican que ellas disminuyen en el plasma sanguíneo con dos fases de metabolización. LH tiene como vida media 20 minutos a 4 horas; FSH 4 a 70 horas y en bovinos es de 5 horas (Gatica 1985).

El extracto hipofisiario equino (EHE) es un preparado crudo que incluye una mezcla de hormonas con una alta concentración de FSH, y en menor cantidad de LH, lo que promueve el crecimiento folicular permitiendo llegar así a una superovulación (Gatica 1990, Letelier 1997, Scoggin y col 2002).

La obtención de EHE fue descrita por Moore y Shelton (1964) (Anexo 1) y se ha utilizado para la obtención de embriones por superovulación (Gatica y col 1990) en diferentes especies como murinos (Araya 1995), conejos (Adams 1982), perras (Corti 2003), ovinos (Boland 1982; Araya 1995), cabras (Salas 1984) bovinos (Araya 1995, Silva 1996, Scoggin y col 2002) y equinos (Scoggin y col 2002), obteniéndose buenos resultados de respuesta ovárica y porcentaje de embriones recuperados. Posee una vida media de 30 minutos en ratones (Nuñez 1994) y de 5 horas aproximadamente en bovino, por lo que desaparece rápidamente de la circulación, haciendo necesario la administración de varias dosis, para inducir el tratamiento de superovulación (Alvarenga y col 2001).

En conejas superovuladas aunque se presenta un incremento en el número de embriones recolectados, el deterioro de ellos pueden reducir este efecto ya que los embriones pueden presentar aberraciones morfológicas, anomalías cromosomales (Kauffman y col 1998, Cheng y col 1999), disminución del número de células y menor volumen intrazonal (Carney y Foote 1990).

3.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

Los parámetros comúnmente usados para la evaluación de embriones incluyen: forma, color y compactación de células, tamaño del espacio perivitelino, células extruidas o degeneradas y tamaño de vesículas (Carney y Foote 1990).

La evaluación del ovocito y su progresión hasta blastocisto ha requerido de indicadores morfológicos que permitan determinar su estado de maduración nuclear y citoplasmática, de la misma manera se utilizan técnicas de la biología molecular para analizar las actividades de proteínas y ADN, principalmente, durante el desarrollo embrionario (González 2004).

Linder y Wrigth (1983) clasificaron los embriones bovinos de acuerdo a dos criterios: grado de desarrollo y calidad:

Clasificación de los embriones según su desarrollo:

Mórula. Es difícil diferenciar los blastómeros individualmente. La masa celular del embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino. Comúnmente se le llama “bola de células”.

Mórula compacta. Debido a la compactación, las uniones de los blastómeros han formado una masa celular, de manera que ya no se aprecian los blastómeros individuales. El embrión ocupa de 60 a 70 % del espacio perivitelino.

Blastocisto temprano. En la masa celular aparece una pequeña cavidad llena de líquido llamada blastocele, el embrión presenta forma de anillo. Aquí las células empiezan a diferenciarse. El embrión ocupa 70 a 80 % del espacio dentro de la zona pelúcida.

Blastocisto. La diferenciación continúa, observándose más oscuras las células del tabique embrionario (o disco embrionario), que origina al embrión y a las células del trofoblasto. El embrión tiene apariencia de anillo y ocupa 90% dentro de la zona pelúcida.

Blastocisto expandido. El diámetro del embrión aumenta 1,2 a 1,5 veces y la zona pelúcida sufre un adelgazamiento.

Blastocisto eclosionado. Son esféricos sin zona pelúcida, con blastocele definido o colapsado, se pueden encontrar en proceso de eclosión o completamente fuera de la zona pelúcida.

Grados de calidad embrionaria:

Grado 1. Excelente. Embrión ideal, esférico, simétrico, células uniformes, buen color y textura.

Grado 2. Bueno. Forma irregular, imperfecciones ligeras, blastómeros levemente extruidos y algunas vesículas.

Grado 3. Pobre o regular. Alteraciones más severas, vesículas, algunas células degeneradas, presencia de blastómeros extruidos.

Grado 4. No transferible. Alteraciones graves, células degeneradas y de diferentes tamaño, gran cantidad de blastómeros extruidos, numerosas vesículas y grandes.

Durante la fecundación, en la mayoría de las especies, sólo un espermatozoide penetra el citoplasma del ovocito. En los conejos no existe esta reacción y es posible encontrar hasta 200 espermatozoides suplementarios en el espacio perivitelino del óvulo fecundado. No se sabe si estos espermatozoides suplementarios participan o no de algún modo en el desarrollo futuro del embrión. Las fases que siguen al proceso de fecundación, que son fundamentalmente iguales en todos los animales, son la fase de segmentación y luego una gastrulación o formación de las hojas germinativas; estas etapas se continúan sin límites precisos, ya que el desarrollo es un proceso continuo. Por su parte los cigoto de los mamíferos son holoblásticos, es decir, el vitelo se segmenta en su totalidad y son isolecitos, ya que las blastómeras son de aproximadamente de igual tamaño. Básicamente son esféricos, y poseen membrana vitelina, zona pelúcida e incluso una capa extra de mucina, como sucede en el conejo (Damianic 1983).

La membrana vitelina, es una diferencia cortical del citoplasma ovárico y la función de difusión y transporte que ella realiza es similar a las membranas celulares de otros animales que no son mamíferos. La segunda capa que rodea al ovocito o zona pelúcida, es una estructura homogénea, semipermeable y compuesta por mucoproteínas neutras o débilmente ácida. La zona pelúcida es atravesada por ramificaciones de las células foliculares que toman contacto con la membrana del ovocito. La tercera capa o capa de mucina es una estructura que sólo se presenta en el cigoto de conejos. La mucina es un mucopolisacárido ácido PAS – positivo que es liberado por las células secretoras del oviducto después de la ovulación (Damianic 1983).

Cuando el embrión alcanza el estado de 32 células se produce la compactación, en la cual las blastómeras pierden su forma esférica y comienzan a adherirse entre ellas; en este estado reciben el nombre de mórula compacta. Al estado de blastocisto aparece por primera vez una diferencia fenotípica entre las células embrionarias distinguiéndose dos poblaciones celulares, el macizo celular interno y el trofoblasto. En general las estructuras embrionarias derivan del macizo celular interno o embrioblasto, mientras que las estructuras extraembrionarias se derivan del trofoblasto. La etapa de blastocisto pre implantacional es acompañada por la acumulación de líquido en el interior del embrión resultando con la formación de una cavidad o blastocele (Garrido 1986).

La segmentación o división celular es quizás la actividad más característica del cigoto a través de su paso por el oviducto, y en la mayoría de los mamíferos el oviducto es capaz de sustentar el desarrollo del huevo durante los primeros 3 – 4 días después de la ovulación (Damianic 1983).

Cuadro 1. Diferentes estados de desarrollo del embrión en conejos designados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).
Different stages of embryo development in rabbits designated for the International Embryos Transfer Society (IETS).

Grado de desarrollo	Edad del embrión (días)	Número de células
2-16 blástomeros	1	2-16
Mórula	2	>16
Mórula compacta	3	32-64
Blastocisto temprano	4	160
Blastocisto	5	180
Blastocisto expandido	5	200
Blastocisto en eclosión	6	>200

El diámetro de los embriones de conejo, incluyendo la zona pelúcida es de 165µm en blastocisto temprano, 200 -500µm en blastocisto, 500-1000µm en blastocisto expandido (Celestinos 2002).

El lugar de ubicación de los embriones varía de acuerdo al tiempo transcurrido post cópula. Entre 12 a 14 horas post cópula (hpc) los embriones se ubican en el oviducto, en la zona del istmo, luego atraviesan la ampulla dentro de un período relativamente corto de 12 horas o menos y posteriormente son distribuidos entre la porción proximal y distal de la unión istmo-ampular alrededor de las 26 horas después de la ovulación; a las 48 horas se señala que los huevos son retenidos en el segmento final del istmo hasta que se dilata la unión útero-tubárica y la peristalsia lleva la corriente del flujo tubárico en dirección a los cuernos uterinos, a las 72 hpc se ubican en el tercio medio del oviducto, último tercio y mitad anterior y posterior de los cuernos uterinos; a las 96 hpc todos los embriones fueron ubicados en la mitad anterior de los cuernos uterinos; entre las 102 y 144 hpc los embriones comienzan a distribuirse en los cuernos uterinos; por lo que se debe realizar un lavado cuidadoso al momento de recuperar embriones (Damianic 1983).

3.4 CULTIVO DE EMBRIONES

Desde las primeras informaciones de cultivo exitoso de embriones de conejo casi un siglo atrás, se han hecho muchos esfuerzos para definir los sustratos requeridos para la viabilidad embrionaria y luego caracterizar cómo son estos sustratos utilizados (Johnson y col 2003).

Las condiciones de los cultivos *in vitro* derivan de las condiciones *in vivo* en muchos aspectos (Fischer y Bavister 1993).

El cultivo de ovocitos y embriones pre implantados requieren un ambiente específico, estable: temperatura, el gas atmosférico y humedad (Vajta y col 1997).

La pérdida de viabilidad se da por: temperatura que *in vivo* es constante, pero que *in vitro* presenta oscilaciones por la manipulación (Kitagawa y col 2004). La temperatura corporal de la especie embrionaria en cuestión es la ideal para el desarrollo *in vitro*. Sin embargo, es conveniente que la temperatura del cultivo esté bajo la temperatura corporal. De esta manera, los efectos tóxicos del medio son menos pronunciados y también es menor la evaporación (Palma y Brem 1993).

La exposición de embriones mamíferos en ambiente de elevadas temperaturas *in vitro* e *in vivo* provoca una disminución del desarrollo embrionario, incrementa la incidencia de blastómeras degeneradas y anomalías embrionarias (Cheng y col 1999).

La luz también afecta en el desarrollo de un embrión, ya que *in vivo* está en la oscuridad, pero *in vitro*, al mirarlo en la lupa, se expone a una intensidad de luz que produce una oxidación de las grasas (Kitagawa y col 2004).

En el intercambio de nutrientes y catabolitos, en un embrión *in vivo*, el aporte y retirada de sustancias se hace de forma continua, pero *in vitro* sólo se aportan en determinados momentos y, por lo tanto, disminuye la concentración de nutrientes e incrementa los metabolitos (Kitagawa y col 2004).

El cultivo de embriones se realiza en medios cuyo pH oscila entre el 7,2 y 7,6 y cuya osmolaridad varía entre 270 y 310 mOsm (igual que el embrión) (Palma y Brem 1993). Kane, ya en 1971, señaló que la osmolaridad óptima de los medios de cultivos para embriones de conejos es de 270 mOsm.

El ion bicarbonato es necesario en mórulas de conejos, para desarrollarse hasta el estado de blastocisto (Farell y Foote 1995). Los medios de cultivo que contienen bicarbonato, requieren de una atmósfera controlada, con presencia de CO₂ para mantener el pH fisiológico. En el sistema buffer bicarbonato/CO₂, los cambios de pH pueden ser realizados cambiando las concentraciones de bicarbonato en el medio o cambiando el CO₂ contenido en el gas atmosférico (Vajta y col 1997b). Estos medios son utilizados en cultivos cuya duración es mayor de 24 horas (Palma y Brem 1993).

La solución buffer fosfato (PBS) y el medio de cultivo TCM 199 (Medio de cultivo celular) son medios convenientes y fáciles de usar (Palma 2001).

El PBS es el medio utilizado comúnmente para la recolección de embriones, así también, cuando el cultivo no se extiende por más de 24 horas, porque no requieren atmósfera con 5% de CO₂. El PBS contiene como sustancia tampón dos sales fosfatadas, y su pH cambia muy poco al contacto con el ambiente, lo que no sucede con el TCM 199 que contiene tampón bicarbonato y el pH no es posible controlarlo en condiciones atmosféricas. Estos medios de almacenamiento de embriones contienen amortiguador HEPES 25mM (N-2-hidroxiethylpiperazina-n'-2-ácido etanosulfónico) (Palma 2001).

Al medio de cultivo, al igual que al de recolección, se le incorpora una fuente de proteína. Estas se efectúan con la suplementación de 0,4% de albúmina ó 10 a 20 % de suero de bovino, filtrado por Millipore, de membranas de 0,22µm de diámetro de poro, y desactivado por calor durante 30 min a 56°C (Hafez 2000). La suplementación proteica tiene distintos fines, los más importantes son: reducir la tensión superficial para favorecer la sedimentación de los embriones y evitar que éstos se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, e incorporar sustancias promotoras del crecimiento que favorecen el desarrollo embrionario, además de absorber e inhibir metales pesados tóxicos que pueden estar presentes en el medio (Palma y Brem 1993).

El oxígeno es un elemento esencial en la producción de energía para el metabolismo de las células de los mamíferos (Tanaka y col 1997), siendo un factor crítico la concentración de oxígeno en los cuales crecen los embriones (Fischer y Bavister 1993).

Los estudios sobre la tensión de oxígeno dentro del tracto femenino han sido de gran importancia en este último tiempo ya que, dependiendo de la especie y el estado, en los embriones preimplantacionales varía ampliamente en las características metabólicas, incluyendo la captación de sustratos y el consumo de oxígeno (Fischer y Bavister 1993).

Las tensiones de oxígenos en cada especie son mucho menores que la mitad del oxígeno atmosférico. Los embriones *in vivo* se desarrollan en bajas concentraciones de oxígenos, sobre todo durante el período de preimplantación (Farell y Foote 1995).

La tasa metabólica de los embriones, basada en la tasa de consumo de oxígeno ha sido medida en conejo y en ratón, detectándose que existe un aumento de la utilización de oxígeno en el estado de mórula media en ratón y mórula tardía-blastocisto temprano en conejo (Garrido 1986).

En los embriones mamíferos los altos niveles de concentraciones de oxígeno durante el cultivo *in vitro* reducen el desarrollo y números de células (Fischer 1993, Tanaka y col 1997, Harvey y col 2004, Kitagawa 2004), esto sucede quizás al incremento de acumulación de radicales libres en los embriones en desarrollo (Fischer y Bavister 1993, Tanaka y col 1997, Kitagawa 2004). Por esta razón se debe bajar la concentración de oxígeno ya que podríamos tener oxidaciones no deseadas, por eso se añade una concentración de N₂ al 90% (Palma y Brem 1993).

Para los embriones de conejo se recomienda una tensión de oxígeno ligeramente menor, por lo que se deduce que las atmósferas gaseosas con niveles de oxígenos más bajos favorecen al desarrollo embrionario *in vitro* (Tanaka y col 1997). En el oviducto de las conejas la concentración de oxígeno no excede de un 5-8% y en útero no es más de 3.5%, lo cual es suficiente para que el embrión alcance el estado de blastocisto (Farrel y Foote 1995).

En estufas de cultivo los niveles de O₂ disponibles no son adecuados para este propósito, como su área interior es grande y la abertura de las puertas son frecuentes por requerimiento del trabajo diario, lo que altera el equilibrio de los cultivos mantenido en el interior perjudicando el desarrollo embrionario (Vajta y col 1997, Kurtz y col 2003).

El ambiente ideal para mantener un embrión en cultivo *in vitro* es del 5% de CO₂ (el más habitual) o del 5% de CO₂ más el 5% de O₂ (Palma y Brem 1993).

Las estufas de CO₂ tienen un costo muy alto, además que la cantidad de gas utilizado es un factor económico limitante para la producción *in vitro* (Kurtz y col 2003).

Estudios realizados en ratones, ovinos y bovinos han demostrado que cultivos en grupos promueven el desarrollo de embriones en comparación con cultivos individuales o co-cultivos con pequeños números de embriones. En embriones de murinos, el desarrollo de los blastocistos son promovidos por un incremento de la densidad en el cultivo en gotas, sugiriendo que factores específicos son secretados por los embriones para influir en el crecimiento y desarrollo de forma autocrina o paracrina (Fujita y col 2005).

HIPÓTESIS

El desarrollo de embriones obtenidos de conejas ovuladas naturalmente es mayor que el de embriones obtenidos por superovulación.

El desarrollo de embriones cultivados en baño de María será igual al de los embriones cultivados en estufa.

OBJETIVOS

Obtener embriones de conejas ovuladas naturalmente.

Obtener embriones de conejas superovuladas con HAP.

Cultivar embriones en tubo a baño María y en placas en estufa.

Evaluar desarrollo de los embriones cultivados *in vitro*, de hembras superovuladas con hembras ovuladas naturalmente.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Animales

Se utilizaron ocho conejas mestizas, sexualmente maduras, las cuales se mantuvieron en jaulas metálicas en el pabellón del Instituto de Reproducción Animal.

Además se usaron dos conejos mestizos, sexualmente maduros, para cubrir las hembras, los cuales se mantuvieron en jaulas individuales.

4.1.2 Hormonas

Se utilizó Extracto Hipofisiario Equino (EHE) preparado en el Instituto de Reproducción Animal, siguiendo el método descrito por Moore y Shelton (1964) (Anexo 1).

4.1.3 Materiales para recuperación de embriones

Placa Petri de 60mm.

Tijeras.

Pinzas hemostática y de disección.

Aguja 26G. con punta roma.

Jeringa de 10 ml.

Tubo plástico falcon de 15ml.

Copas de vidrio.

Medio de colección: tampón salino fosfato (PBS) adicionado con 5% de suero bovino.

Platina temperada.

Microscopio estereoscópico.

4.1.4 Materiales para cultivo de embriones

Placas Petri de 35mm para cultivo

Micropipetas.

Medio de cultivo TCM199

Aceite mineral.

Estufa de cultivo.

Tubos de vidrio de 5 ml.

Baño de agua.

Cámara de flujo laminar.

4.1.5 Materiales para evaluación de embriones

Placas petri de plástico.
Microscopio invertido Nikon.
Micrómetro.

4.2 MÉTODO

Las 8 conejas utilizadas fueron pesadas (Anexo 5), obteniendo un peso corporal promedio de 3,3 kg por hembra, luego fueron separadas en dos grupos de cuatro hembras cada uno. Un grupo fue tratado con la hormona para superovular y el otro grupo, de ovulación natural, fue utilizado como grupo control.

Las hembras del grupo control fueron observadas diariamente para determinar el celo por coloración vulvar, seleccionando las hembras que presentaban una vulva en estado de turgencia y coloración rojo-púrpura, para ser llevadas a la jaula del macho y ser cruzadas dos a tres veces.

4.2.1 Superovulación de conejas

La efectividad de EHE se probó en ratones hembras Rockefeller de 23 días de edad, utilizando seis hembras prepúberes, las cuales fueron divididas en tres grupos: en el primero fueron inoculadas con 7.5mg de EHE intraperitoneal (IP), en el segundo grupo fueron inoculadas con 3mg de EHE, IP, repitiendo la dosis 24 horas después, y el tercer grupo fue utilizado como control. A las 44 horas después de la primera dosis de EHE se aplicó una dosis de 5 mg de HCG, 12 horas después se sacrificaron las ratonas para extraer útero y ovario los cuales fueron pesados, observándose un incremento en el peso útero ovario del 192% en el primero y del 244% en el segundo grupo en relación al grupo control (Anexo 4).

Luego de comprobada la efectividad del extracto en ratones hembras, las conejas que presentaron una vulva pálida y pequeña, fueron superovuladas administrándoles una dosis de 2,5 mg/kg de EHE cada 12 horas por dos días vía subcutánea (sc). Previo a la inoculación, la hormona fue suspendida en 1 ml de agua destilada esterilizada.

Luego de 24 horas después de la última dosis del tratamiento hormonal, se evaluó la presencia de celo por coloración vulvar. Las hembras que presentaron celo fueron llevadas a la jaula del macho para ser cruzadas dos a tres veces. Sólo una hembra no presentó signos de celo durante este tiempo, la cual siguió siendo observada hasta 72 horas después de terminado el tratamiento hormonal, tiempo en el que presentó cambio de coloración vulvar a rojo-púrpura aceptando al macho.

4.2.2 Preparación de los medios

Al medio TCM 199, para el cultivo (Anexo 3), se le adicionó 220 mg de piruvato de sodio, 500 mg de gentamicina y 10% de suero fetal bovino, para luego ser filtrados en filtro millipore de acetato de celulosa de 0.22 μm . Este medio fue utilizado para ambos métodos de cultivo.

Se preparó una placa de cultivo de 35mm de diámetro con 5 microgotas de 50 μl de medio de cultivo y luego se cubrieron con aceite mineral, para evitar la evaporación, contaminación y pérdida de calor. Las placas así preparadas se llevaron a incubación para equilibrar el medio con la atmósfera a 38,5°C con ambiente saturado de humedad (CO₂ 5%), mínimo dos horas antes de transferir los embriones a las placas.

Los tubos de vidrio de 5 ml se llenaron con medio TCM 199, luego fueron puesto en el baño María a 38.5°C, para adquirir la temperatura adecuada, previo a ser utilizados para el cultivo de los embriones.

4.2.3 Recolección de embriones

Para ambos grupos de hembras la recolección de embriones se realizó con el mismo método. A las 48 horas después de la última cópula, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical.

Se realizó la separación del tracto genital de la hembra donante, mediante la disección de los oviductos y cuernos uterinos. Los oviductos fueron seccionados de los cuernos a 0,5 cm de la unión útero-tubárica. Para el lavado de los oviductos se utilizó una aguja 26G con punta roma, la cual fue insertada por la entrada del oviducto a nivel del infundíbulo-ámpula (Figura 1), cada oviducto se lavó con 20 ml de medio PBS al 5% de suero bovino (SB) (Anexo 2), recolectándose el medio en copas de vidrio previamente temperadas sobre una platina a 37°C (Figura 2). Luego se realizó el lavado de los cuernos uterinos, insertando una aguja 26G con punta roma por delante de la bifurcación intercornual, cada cuerno se lavó con 10ml de PBS adicionado con suero bovino (SB) al 5%, recolectándose en copas de vidrio, previamente temperadas.

Los embriones obtenidos fueron identificados bajo un microscopio estereoscópico, transferidos a una placa Petri de 60mm de diámetro con 2 ml de PBS al 5% para determinar sus características morfológicas, las cuales fueron evaluadas de acuerdo a la pauta descrita por Linder y Wright (1983) y luego fueron medidos con un micrómetro en un microscopio invertido Nikon. Los embriones en estado de mórula (Figura 3) fueron lavados tres veces en medio TCM 199 en una placa Petri de 35mm antes de ser llevados a cultivo.

4.2.4 Cultivo de embriones

Los embriones recolectados de cada hembra fueron divididos en dos grupos para ser cultivados en estufa y en baño María respectivamente. Ambos métodos de cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 38,5°C, por 72 horas.

Para el cultivo en estufa los embriones fueron puestos en placas Petri de 35mm, previamente preparadas. Los embriones se mantuvieron en estufa de cultivo con atmósfera controlada saturado de humedad (CO₂ 5%).

Para el cultivo en baño María, los embriones fueron puestos en los tubos de vidrio, previamente preparados, manejo que se realizó en la cámara de flujo laminar. El tubo fue llenado con medio TCM 199, y al momento de cerrarlo el aire fue retirado a través de una aguja 32G puesta en la tapa de goma del tubo.

4.2.5 Evaluación de embriones

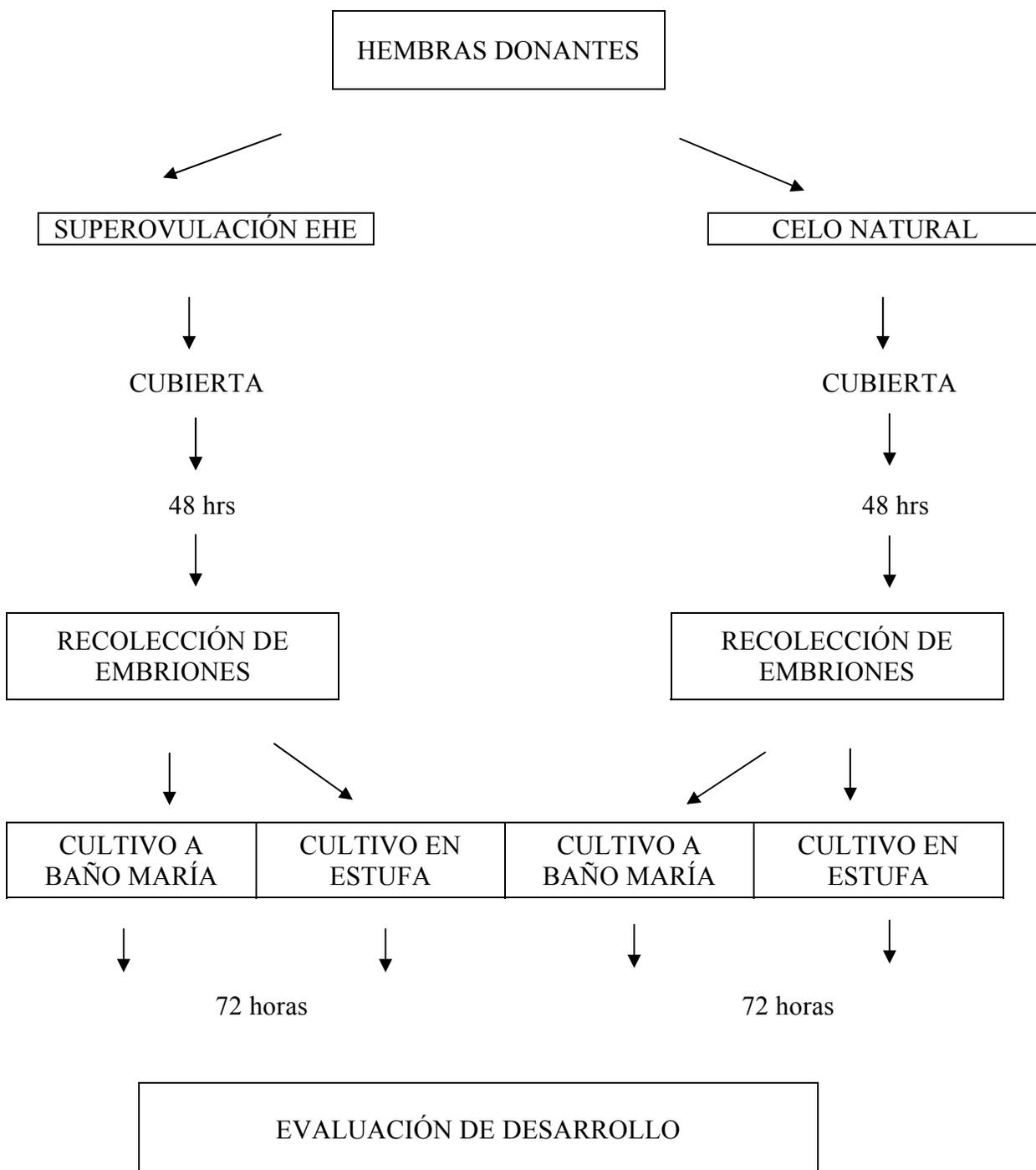
Los embriones cultivados en baño María, luego de las 72 hrs., fueron transferidos del tubo a una placa Petri para facilitar su manejo al momento de realizar su observación y evaluación.

El desarrollo de los embriones, posterior al cultivo *in vitro* para ambos métodos, fue evaluado observando la apariencia morfológica de acuerdo a la pauta descrita por Linder y Wright (1983), verificando la formación del blastocele, presencia de macizo celular interno y trofoblasto. Los embriones que presentaron desarrollo a estado de blastocisto, fueron medidos con micrómetro calibrado en microscopio invertido Nikon.

4.2.6 Análisis Estadístico

La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de proporciones, con un nivel de significancia de 0,05. Tales análisis se realizaron con el programa computacional Statistix ® 8.

Los resultados son presentados en cuadros mediante cifras absolutas y porcentajes.

Esquema de trabajo.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.

De la recolección de embriones de los grupos de hembras superovuladas y no superovuladas se obtuvieron los siguientes resultados:

Del total de conejas (8) en estudio se obtuvo 157 ova recolectadas, de las cuales 152 fueron ova fecundadas encontrándose en estado de mórulas (Figura 3) y 5 fueron ova sin fecundar pertenecientes al grupo de hembras superovuladas (Cuadro 2).

El mayor número de ova se obtuvo de las hembras que fueron superovuladas con un promedio de 29,5 ovas fecundadas por hembra, y en el grupo de hembras no superovuladas se obtuvo un promedio de 8,5 ovas fecundadas por hembra.

Cuadro 2: Número y promedio de ovas recolectadas de ambos grupo de hembras.
Number and mean of collected ovocitos of both female group.

Ova	HSO		HNSO	
	Nº	Promedio±D.S. /Hembra	Nº	Promedio±D.S. /Hembra
Fecundadas	118	29,50±6,0	34	8,50±2,3
No Fecundadas	5	1,25±0,9	0	0,00
Total	123	30,75	34	8,50

HSO: hembras superovuladas.

HNSO: hembra no superovuladas.

5.2 RESULTADOS DEL DESARROLLO DE EMBRIONES EN CULTIVO *IN VITRO*.

5.2.1 Hembras superovuladas.

Para el grupo de hembras superovuladas se seleccionaron 67 ova para cultivo en baño María y 51 ova para cultivo en estufa.

En el cultivo a baño María 24 ova no fueron consideradas en los resultados (7 por contaminación del tubo, 7 por mala manipulación y 10 por falla de suministro eléctrico en el equipo).

En el cultivo de estufa no se consideraron en los resultados 16 ova, 14 ova que fueron eliminadas por ser provenientes de la misma hembra cuyas ova fueron eliminadas en el cultivo paralelo y 2 por mala manipulación.

De las ovas consideradas en el estudio (Cuadro 2), luego de ser cultivadas por 72 hrs., en el cultivo en estufa se obtuvo desarrollo de embriones al estado de blastocisto, mientras que en el cultivo en baño María no se obtuvo desarrollo.

5.2.2 Hembras no superovuladas.

Las 34 ova recolectadas en estado de mórula fueron cultivadas *in vitro*. Se obtuvo desarrollo de ova a estado de blastocisto, tanto para el cultivo en estufa como para el cultivo en baño María (Figura 4), siendo mayor para el cultivo en estufa (Cuadro 2).

Los blastocistos obtenidos de los diferentes cultivos fueron medidos con un micrómetro calibrado, con valores entre 164µm a 169µm diámetro.

Cuadro 3: Porcentaje de desarrollo de embriones, según dos métodos de cultivo *in vitro*.

Percent of development of embryos, according to two methods of culture *in vitro*.

ESTADO EMBRIONARIO	HSO		HNSO	
	Estufa	Baño María	Estufa	Baño María
N ^a Mórula	35	43	17	17
N ^a Blastocisto	28	0	15	5
% Desarrollo	80	0	88,2	29,4

HOS: hembras superovuladas.

HNSO: hembras no superovuladas



Figura 1. Ovario de coneja superovulada con EHE, cuerpos luteos y folículos hemorrágicos.
Ovary of female rabbit superovulote with HAP, *corpus luteum* and hemorrhagic follicles.

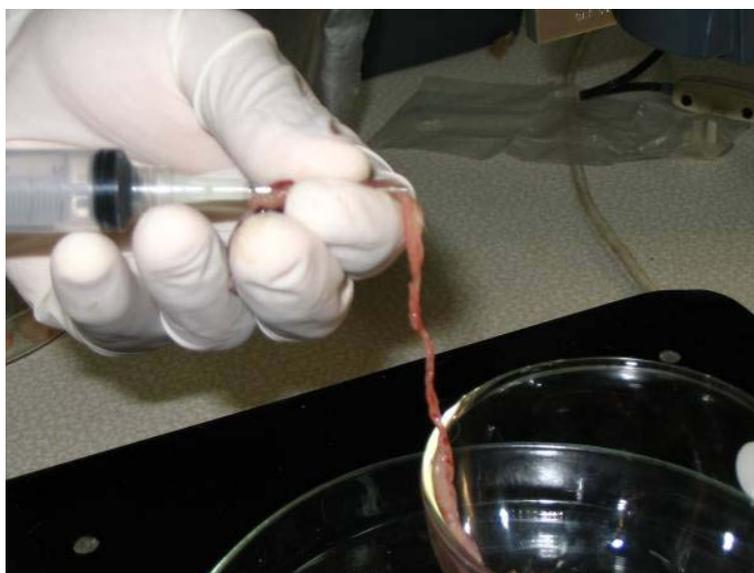


Figura 2. Lavado de oviductos de conejas para recolección de embriones.
Rabbit Oviduct flushing to embryo collection at 48 hrs. post matting.

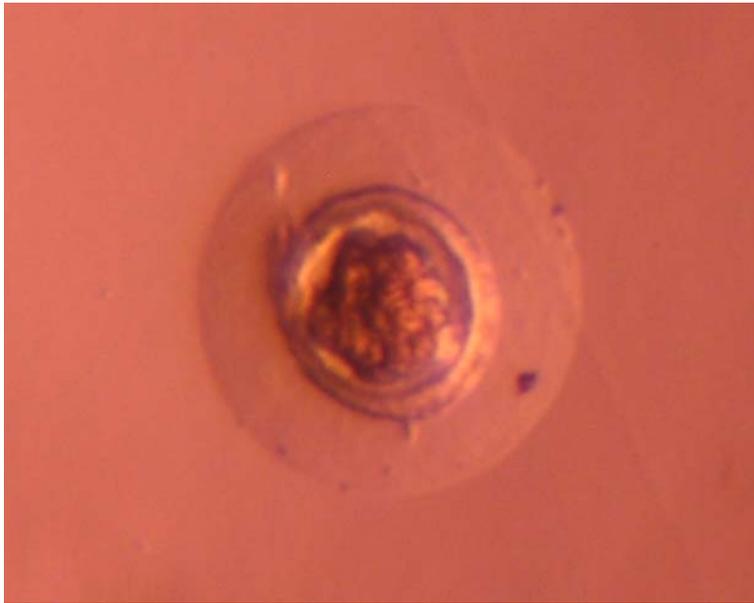


Figura 3. Embrión de coneja Supérovulada en estado de mórula de 48 horas.
Embryo of superovulated rabbit female in morulae stage of 48 hours.



Figura 4. Embrión de coneja obtenido por ovulación natural, en estado de blastocisto cultivado en baño María por 72 horas.
Embryo of natural ovulated rabbit female in blastocyst stage cultivated in water bath for 72 hours.

6. DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue comparar el desarrollo de embriones de conejo en estado de mórula, en dos métodos de cultivo *in vitro*, hasta el estado de blastocisto. Los embriones fueron recuperados de hembras superovuladas y no superovuladas, comprobando así la efectividad de EHE en la actividad ovárica.

Las conejas utilizadas fueron pesadas para determinar a través de su peso corporal si ya habían alcanzado la pubertad, los cuales se encontraron dentro de los rangos estimados para hembras adultas como lo señala Alvarino (1993), con un promedio de 3,3 Kg. por hembra, considerando de este modo que las hembras eran sexualmente maduras.

La presencia o ausencia de celo en las hembras se realizó de acuerdo a la coloración vulvar. Las hembras que presentaron una vulva de coloración pálida y pequeña, al ser puestas dentro de la jaula del macho no aceptaron la monta reaccionando con violencia. Por el contrario, las hembras que presentaron una vulva de color rojo-púrpura y en estado de turgencia, al ser puesta dentro de la jaula, aceptaron al macho. Se demuestra así que el color vulvar de la hembra es un signo externo certero de la presencia de estrógenos, siendo muy útil en la estimación de la receptividad de la hembra al macho, lo que concuerda con lo señalado con Tsiligianni y col (2004).

Para iniciar el tratamiento de superovulación se seleccionaron las hembras que presentaron una vulva pálida y pequeña (ausencia de celo), ya que se ha demostrado que las relaciones altas de FSH y LH afectan la capacidad del ovario para responder a los tratamientos con gonadotropinas exógenas (Del Campo y col 1990).

La ventaja de la EHE consiste en ser una hormona que fácilmente es preparada en el laboratorio a partir de hipófisis disponibles desde los mataderos, obteniendo un producto de bajo costo con el método de Moore y Shelton (1964). Sin embargo, contrario a lo que describe Araya (1995), se presentan dificultades para el manejo de ella, como es la repetición de la dosis, debido a su corta vida media y la dificultad que se presenta al momento de la inoculación; ya que se puede observar restos de EHE en la jeringa por lo que no se consigue aplicar la dosis en su totalidad. Por esta razón se debió suspender nuevamente el resto de la hormona en agua destilada, para lograr la inoculación del máximo posible de la dosis. Esto hace que sea irregular la cantidad de hormona que se aplica en cada hembra, y como consecuencia de esto la respuesta ovárica se puede ver disminuida.

Luego de 24 horas de finalizado el tratamiento, el 75% (3) de las hembras presentaban una vulva edematizada y de color rojo-púrpura, y una clara aceptación al macho, quedando en evidencia así el aumento de la calidad de hormonas circulantes en su organismo provocado por el efecto gonadotrófico de EHE. Sólo en una hembra se detectó

celo a las 72 horas determinado el tratamiento lo que concuerda con Alvariño (1993) quien señala que aún después de 48 a 72 hrs de la aplicación de gonadotropinas las hembras aceptan la cópula o pueden ser inseminadas. La detección tardía de una sola hembra también se puede considerar como una hembra con expresión de celo más débil o una mala detección por parte del observador.

La clasificación de los embriones recolectados de ambos grupos de hembras se realizó de acuerdo al desarrollo alcanzado por el embrión según el número progresivo de células establecido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones para embriones de conejos. Se señala que a las 48 hpc el embrión de conejo presenta más de 16 células, por lo que se hace difícil contarlas, por lo tanto en este estudio se consideró el estado de mórula de un embrión cuando no fue posible contar el total de sus células o cuando este presentó sus células compactadas. También la clasificación se realizó en base a la calidad del embrión según lo señalado por Linder y Wright (1983) en una escala de cuatro niveles. Se consideró la compactación de células, forma esférica, color, con una zona pelúcida íntegra, células degeneradas y tamaño de vesículas, como características importantes para seleccionar es de modo subjetivo y dependiente del técnico, no siendo ésta una verdad absoluta como explica Tanaka y col (1997).

En la recolección de las ova que fue realizada a las 48 hpc, lavando los oviductos, se encontró diferencias entre ambos grupos de hembras. Las ova del grupo de hembras no superovuladas se encontraron en estado mórula compacta lo que concuerda con lo señalado por Damianic (1983) en la ubicación de las ova y el tiempo post cópula para ese estado de desarrollo. Para el grupo de hembra superovuladas se encontraron, además de ova en estado de mórula, ova que presentaban un desarrollo menor (dos y 8 células), efecto que se produce por la superovulación como cita Carney y Foote (1990), sin embargo estas ova fueron llevadas a cultivo *in vitro* en estufa por 72 hrs. presentando desarrollo a estado de blastocisto. Es importante señalar que sólo en el grupo de hembras tratadas con EHE se presentaron ova sin fecundar (5), lo que coincide con Rustan y Maillot (1991), que observaron que la aplicación de hormonas para superovular puede provocar la ovulación de óvulos inmaduros que no se fecunden.

Según lo señalado por Kauffman y col (1998), los embriones en hembras superovuladas tienen un avance más rápido por el tracto reproductivo, por lo que en este estudio se realizó el lavado de los cuernos en estas hembras, sin embargo, sin obtención de embriones.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la respuesta ovárica de las conejas a la EHE tiende a ser confiable y muy satisfactoria como lo señaló Adams (1982). En este estudio el 100% (4) de las conejas tratadas con EHE respondió al tratamiento superovulatorio obteniendo un promedio de 29,5 ova fecundadas por hembra. Este resultado es inferior al señalado por este mismo autor que al utilizar EHE en dosis más baja pero por un tiempo más prolongado, obtuvo 36,9 embriones por hembra, por lo que se puede concluir que la respuesta ovárica es mayor cuanto más tiempo esté la hormona circulante (Alvarenga y col 2001).

Las hembras del grupo control no se les administró gonadotropinas con actividad folículo estimulante por lo que su respuesta fue bastante inferior a la presentada por las hembras tratadas, con un promedio de 8,5 ovas fecundadas por hembra, encontrándose dentro del rango natural de la especie, que va de 8 a 10 embriones, señalado por Alvaríño (1993). Kauffman y col (1998) obtuvo un promedio de 7.8 embriones de conejos por hembra sin superovular y Chrenek y col (1998) encontraron un promedio de 9 embriones por hembra. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede considerar que la recolección de embriones en este estudio estuvo dentro del promedio normal de la especie.

Los cuerpos lúteos presentes en los ovarios (Figura 2) no fueron contados en su totalidad en hembras superovuladas, por lo que el número de cuerpos lúteos no fue coincidente con el número de embriones recolectados y no se consideraron en los resultados en el ensayo.

El cultivo embrionario *in vitro* se realizó por un periodo de 72hrs, tiempo en el cual el embrión de coneja alcanza el estado de blastocisto *in vivo*. Para determinar si los embriones alcanzaron este estado de desarrollo en cultivo *in vitro*, fueron observados de acuerdo con sus características morfológicas que concuerdan con Linder y Wright (1983) para el estado de blastocisto temprano, y fueron medidos alcanzando un diámetro de entre 164 μ m y 169 μ m como lo señala Celestino (2002) para este estado de desarrollo en embriones de conejo.

El porcentaje de desarrollo para el cultivo en estufa en los embriones recolectados del grupo de hembras no superovuladas (88,2%) fue mayor que para el grupo de embriones de hembras superovuladas (80%), la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), quedando demostrado que el cultivo en estufa es ideal para el desarrollo de ambos grupo de embriones.

En este estudio los embriones obtenidos del grupo de hembras no superovuladas, en el cultivo a baño María, presentaron desarrollo hasta estado de blastocisto, pero con un menor porcentajes (29,4%) con respecto al mismo grupo de embriones para cultivo en estufa (88,2%), esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En general los resultados del desarrollo embrionario por grupo de hembras fue mayor para las no superovuladas en ambos cultivos, presentando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), con respecto a las hembras superovuladas.

Si bien ambos métodos de cultivo realizados tenían factores comunes como el medio de cultivo, temperatura y el tiempo en que se mantuvieron en cultivo los embriones, se modificó la presencia de atmósfera, la cual estuvo ausente en el cultivo a baño María.

Como señala Fischer y Bavister (1993), las bajas concentraciones de oxígeno son adecuadas y favorecen al desarrollo de embriones de conejos en cultivo en estufa, sin embargo la falta total de oxígeno atmosférico es un factor que afecta negativamente el desarrollo de embriones cultivados en baño María, pues el oxígeno es necesario para el

metabolismo embrionario y el consumo de oxígeno aumenta junto con el estado de desarrollo embrionario, siendo mayor en el estado de blastocisto que en el estado de mórula.

La ausencia de CO₂ también resulta ser un factor adverso en el cultivo a baño María, ya que se ve alterada la relación bicarbonato/CO₂, como lo señala Vajta y col (1997b) con lo que no se lograría una regulación del pH del medio, siendo desventajoso para el desarrollo embrionario.

Si bien la densidad embrionaria no fue un factor que se consideró en los objetivos de este trabajo, analizando los resultados se puede considerar la influencia que este factor puede tener en el desarrollo de embriones para el cultivo *in vitro*. En el estudio desarrollado por Fujita y col (2005), un incremento en el número de embriones cultivados mejora la tasa de formación de blastocisto incluso con un volumen constante de medio de cultivo por embrión, sugiriendo la posibilidad de que factores específicos derivados de los embriones cultivados promuevan el desarrollo embrionario. En el presente estudio, el cultivo en baño María fue realizado con una menor densidad embrionaria, 7 embriones por 5 ml en promedio, que el cultivo en estufa cuya densidad fue de 4 embriones por 50µl, lo que favorecería la acción de los factores específicos mencionados por Fujita y col. (2005) lo cual influiría en el mayor desarrollo embrionario observado en el cultivo en estufa.

El sistema de cultivo a baño María con embriones en tubos, en sí no resulta ser desventajoso, ya que autores como Kurtz y col (2003) han obtenido buenos resultados en maduración y fecundación de ovocitos de bovino pero introduciendo aire dentro de los tubos. Sin embargo, se puede concluir para este trabajo que el método de cultivo en baño María sin aire en los tubos es un método fácil y económico pero no es efectivo para alcanzar altos porcentajes de desarrollo de los embriones.

7. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados, se puede concluir lo siguiente:

Es posible inducir superovulación en conejas con EHE.

El cultivo en estufa con atmósfera controlada es mejor método de cultivo que el de baño María.

Los embriones recolectados de hembras sin superovular alcanzaron un mejor desarrollo en ambos métodos de cultivo *in vitro* que los recolectados de hembras superovuladas con EHE.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adams C. 1982. Mammalian Egg Transfer. Cambridge England. Pp: 2-4, 29-46.
- Alvarenga M, McCue P, Bruemmer J, Neves Neto J, Squires E. 2001. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 56 ,879-887.
- Alvariño M. 1993. Control de la Reproducción en el Conejo. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Araya J. 1995. Inducción de superovulación en murinos, ovinos y bovinos utilizando un extracto hipofisiario equino (HAP). Tesis, Magister en Ciencias, Mención en Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Betteridge K 1995. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 44, 1061-1098.
- Boland M, Gordon I. 1982. Effect of repeated horse anterior pituitary extract treatment on ovulatory response in the ewe. *Veterinary Record* 111, 391-392.
- Britton E. 1988. Congelación y micromanipulación de embriones de coneja. Tesis, Magister en Ciencias, Mención en Reproducción Animal, Universidad de Chile, Valdivia, Chile.
- Carney E, Foote R. 1990. Effectes of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fert* 89, 543-551.
- Carruthers T. 1986. Principles of hormonal therapy in Theriogenology. In: Morrow D (ed). *Current therapy in theriogenology*. Pp 3-13. 2° Ed. Philadelphia. W B Saunders.
- Celestinos M. 2002. Evaluación de la sobrevivencia *in vitro* de embriones de coneja bipartidos antes y después de la vitrificación. Tesis, Magister en Ciencias, Mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Cheng H, Dooley M, Hopkins M, Anderson L, Yibchok-Anun S, Hsu W. 1999. Development of rabbit embryos during a 96-h period of *in vitro* culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Animal Reproduction Science* 56, 279-290.

Chrenek P, Markarevich A, Vasicek K, Laurincik, Bulla J, Gajarská T, Rafay J. 1998. Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryo *in vitro*. *Theriogenology* 21, 230. (abstract).

Corti L. 2003. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*canis familiaris*), en ova recuperadas de perras en celo inducido. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Damianic T. 1983. Contribución al estudio del desarrollo embrionario en el conejo (*Oryctolagus Cuniculus*) en los primeros 6 días de gestación. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

De Blas C, Nuria N. 2001. Interacción nutrición–reproducción en Conejas reproductoras. XVII Curso de especialización FEDNA. Departamento de Producción Animal. Universidad Politécnica de Madrid.

Del Campo M R, Becerra F, Gonzales M, Murphy B, Mapletoft R.J. 1990. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. *Theriogenology* 33, 208.

Farrell PB. and Foote RH. 1995. Beneficial effects of culturing rabbit zygotes to blastocysts in 5% oxygen and 10% carbon dioxide. *Journal of Reproduction and Fertility* 103, 127-130.

Fischer B, Bavister B. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 99, 673-679.

Fujita T, Umeki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K. 2005. Effect of group culture and embryo-culture conditioned médium on development of bovine embryo. *Journal of reproduction and development*. In press.

Garrido O. 1986. Embriogenesis en etapa preimplantacional. En: Del Campo M (ed). *Compendio curso de criopreservación de embriones de mamíferos*. Pp 6-23 Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

GATICA R. 1985. Hormonoterapia reproductiva en el bovino. *VII Jornadas Latinoamericanas de Buiatria*, Valdivia, Chile.

Gatica R, Hoffman M, Correa J. 1990. Use of a horse anterior pituitary extract (HAP) and pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) for superovulation in cattle. In: *Joint Ifs-sipar Seminar on animal Reproduction*. Montevideo-Paysandú. Uruguay.

González H. 2004. Efecto del ácido ascórbico como elemento antioxidante sobre el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénéticos de cerda. Tesis, Magíster en Ciencias, Mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Hafez ESE, Hafez B. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7° Ed. Interamericana. Kiawah Island, South Carolina, USA.

Harvey AJ, Kind K, Pantaleon M, Armstrong D, Thompson J. 2004. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biology of Reproduction* 71, 1108-1119.

Johnson M, Mahmood S, Patel M. 2003. Intermediary and energetics during murine early embryogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 31457-31460.

Kane M, Foote R, 1971. Factors affecting blastocyst expansion of zygotes and young embryos in defined media. *Biology of Reproduction* 4, 41-47.

Kauffman R, SchmidT P, Rall WF, Hoeg J.1998. Superovulation of rabbits with FSH alters *in vivo* development of vitrified morulae. *Theriogenology* 50, 1081-1092.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. 2004. Effects de oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62, 1186-1197.

Kraemer D, Bowen M. 1996. Embryo transfer in laboratory animal. In; Morrow D (ed). *Current Therapy in Theriogenology*. Pp:73-75 2° Ed. Philadelphia, W. B. Saunders.

Kurtz M, Batistella M, Mondino C, Pereira L, Faustino D, De Sá Filho F, Souza J. 2003. *In vitro* Production of bovine embryo in tubes without gaseous atmosphere control. *Braz J Vet Res Anim Sci* 40, 3.

Letelier C. 1997. Efectos del origen de la FSH en la inducción de superovulación en ovejas. Tesis M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Linder, GM and Wright RW. 1983. Bovine embryo morphology evaluation. *Theriogenology* 20, 407-416.

May D, Simpson K. 1975. Reproduction in the rabbit. *Animal Breeding Abstracts* 43, 256-257.

Moore N, Shelton J. 1964. Response of the ewe to a horse anterior pituitary. *Jornual of Reproduction and Fertility* 7, 9.

Núñez M. 1994. Evaluación del efecto de los tratamientos hormonales sobre el desarrollo de embriones de ratón cultivados “*in vitro*”. Tesis, T.M., Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Palma G, Brem G. 1993. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. Argentina.

Palma G. 2001. Producción *in vitro* de embriones bovinos. En: *Biotecnología de la Reproducción*. Ed INTA. Balcarce. Argentina.

Ruiz L. 1983. El conejo manejo alimentación patología. 2ª ed. Mundi-Prensa. Madrid. España.

Roustan A, Maillot D. 1991. Efecto de la inyección de GnRH (Receptal) sobre la fertilidad y la productividad numérica de conejos sometidas a cubrición natural. *Cuniculture*, 84:89-91.

Scoggin C, Meira C, McCue P, Carnevale E, Nett T, Equires E. 2002. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology* 58, 151-164.

Salas F 1984. Inducción de superovulación en cabras (*capras hircus*). Tesis, Magíster en Ciencia Mención, Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile.

Silva M. 1996. Evaluación de dos métodos de inducción de mellizos mediante transferencia de embriones. *Tesis de grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Silva M. 2001. Cultivo de embriones bovinos en TCM 199 condicionado con células oviductuales bovinas en suspensión. Tesis, Magíster en Ciencias Mención, Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Stockebrand C. 2003. Desarrollo de una técnica asistida por laparoscopia para la recolección de embriones en ovejas. *Tesis de grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Tanaka H, Ballarales P, Masaki J, Kanagawa H. 1997. Teoría y práctica de la fecundación *in vitro*. Agencia de Corporación Internacional del Japón. Valdivia, Chile.

Tsiligianni T, Saratsi A, Besenfelder U, Anastasiadis A, Vaninas E, Saratsis P, Brem G. 2004. The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology* 61, 989-995.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. *Theriogenology* 48, 1379-1385.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997b. Effect of pH culture médium on *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 47,286.

9. ANEXOS

Anexo 1. Preparación del Extracto Hipofisiario Equino (EHE), descrito por Moore y Shelton (1962).

- 1.- Recolección y congelación de hipófisis equinas.
- 2.- Trituración y homogenización de las hipófisis congeladas en una solución de cloruro de sodio al 2%, en proporción de 4 ml. De solución por gramo de hipófisis.
- 3.- Centrifugación del homogenizado a 1500 rpm. Por 20 min.
- 4.- El sobrenadante es filtrado a través de lana de vidrio y se determina de su volumen (reservar).
- 5.- Resuspensión del residuo en cloruro de sodio y nueva centrifugación.
- 6.- Filtración del sobrenadante a través de lana de vidrio y determinación de volumen.
- 7.- Eliminación del residuo resultante.
- 8.- Adición al sobrenadante de 4,2 volúmenes de alcohol de 96° y mantención en reposo hasta el día siguiente a temperatura de refrigeración.
- 9.- Filtración a través de género en matraz kitasato conectado a un sistema de vacío y posterior lavado del precipitado obtenido, primero con alcohol de 96° y luego con éter.
- 10.- Secado del precipitado en campana de vidrio al vacío conteniendo en su interior silica gel.
- 11.- Remoción, pesaje y molido del precipitado y posterior almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- 12.- Resuspensión previo a su uso en agua destilada estéril o en suero fisiológico estéril.

Anexo 2. Preparación de la solución buffer salina fosfato (PBS).

Componentes	g/l
Cloruro de sodio	8.00
Cloruro de potasio	0.20
Cloruro de magnesio x 6 H ₂ O	0.10
Cloruro de calcio x 2 H ₂ O	0.10
Fosfato disódico	1.15
Fosfato monopotásico	0.20
Acido pirúvico, sal sódica	0.036
Glucosa	1.00
Penicilina	200.000 U.I.
Estreptomina	50 mg/l
Agua bidestilada	csp

Procedimiento:

1. Disolver la penicilina y estreptomina en parte del agua bidestilada.
2. Disolver sólo el cloruro de calcio en agua bidestilada.
3. Disolver los demás componentes conjuntamente en agua bidestilada.
4. Mezclar todos los componentes disueltos en un matraz, aforar a 1 lt. de agua bidestilada.
5. Medir pH ajustar a 7.2 con NaOH si fuese necesario
6. Esterilizar la solución con filtro Millipore de 0.22 mcm.
7. Conservar a 4°C hasta el momento readicionar el suero inactivado de ternero.

Todo el procedimiento debe ser realizado a temperatura ambiente de 20°C aprox.

Anexos 3. Preparación del medio de cultivo TCM 199.

MEDIO DE CULTIVO

TCM 199	1.5 g
NaHCO ₃	0.22 g
Agua destilada	100 ml

Ajustar pH 7.2 y filtrar x 0,20 ul.

STOCK DE PIRUATO (1MES)

Piruvato de sodio	55 mg
Solución salina	5 ml

STOCK ANTIBIÓTICO

Gentamicina	50 mg
Solución salina	1 ml

MEDIO DE TRABAJO

TCM-199 (Sigma)	9 ml
Suero bovino inactivado	1 ml
Piruvato	20 ml
Antibiótico	10 ml

Anexo 4. Cuadro 1: Resultados con relación al peso del animal (gr), y al peso de útero/ovarios (mg), en las 2 hembras del grupo control y en las 3 tratadas con EHE, para probar su efectividad.

Resultates of body weigth (gr), and weigth uterus/ovary (mg) in control group female and three females treated with HAP, to proved his efficacy.

EHE	Peso		
	Animal (gr)	Útero/ovario (mg)	x
0 mg	9.75	19.7	24.1
0 mg	10.2	28.5	
3 mg x 2	12.35	52.9	58.95
3 mg x 2	13.52	65.0	
7.5 mg	9.74	46.4	46.4

Con esto se comprobó la eficiencia de la EHE preparada según el método descrito por Moore y Shelton (1964).

Anexo 5. Peso por conejas, dosis de EHE, número de cuerpos luteos y folículos, número de ova fecundadas y no fecundadas, según superovulación (HSO) y ovulación natural (HNSO).

Body weight per rabbits, EHE dose, number of *corpus luteum* y follicles, number of fecunded ovocytes and non fecunded ovocytes, in superovulated (HSO) and non superovulated female (HNSO).

Coneja N°	HSO				HNSO			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso Kg.	2,80	2,758	3,685	3,196	2,854	3,5	3,6153	3,486
Dosis/HAP mg	7	6,895	9,046	7,99	-	-	-	-
Cuerpo luteo	28	23	20	18	10	11	9	7
Folículos	4	12	14	3	2	4	1	3
Ovas fecundadas	33	23	26	36	10	10	9	5
ovas sin fecundar	2	0	1	2	0	0	0	0
Total ovas	35	23	27	38	10	10	9	5

Anexo 6. Número de mórulas recolectadas y eliminadas, blastocistos expandidos y mórulas no desarrolladas, según el cultivo en baño María y en estufa.

Number of collected and eliminated morules, blastocyst, expanded blastocyst and development morules, according to culture method.

Coneja N°	1		2		3		4		5		6		7		8	
Cultivo	Estufa	Baño María														
N° de Mórulas	14	19	12	11	15	11	10	26	5	5	5	5	4	5	3	2
Mórulas eliminadas	2	10	7	7	-	-	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-
Blastocisto	6	0	2	0	4	0	3	0	1	0	4	3	4	0	2	2
Blastocisto expandido	4	0	3	0	6	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
Mórulas no desarrolladas	2	10	0	4	5	11	0	19	0	5	1	2	0	5	1	0

10. AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a:

Dr. Renato Gatica, profesor patrocinante por los consejos que ayudaron a la realización de este trabajo.

Dr. Jorge Correa por la comprensión y sabias palabras entregadas.

Sr. Carmen Schüller por su preocupación en todo momento tanto de mi trabajo como de mi nutrición. Gracias por su cálida acogida durante el tiempo que estuve en el instituto.

Carola por su amistad y gran ayuda en los trámites burocráticos de esta universidad.

A mi amigo Cristian por su ayuda y paciencia, y a la Dr. Ellen Brummer por el tiempo compartido y la buena onda.

A Ruben y Sergio por su cooperación y buena voluntad y a todos aquellos que de una u otra forma colaboraron desinteresadamente en la realización de este trabajo.

A la sala del café donde compartí entretenidas e interesantes conversaciones, ricas comidas y descubrí buenas personas y grandes amigos.

Mis amigas Vivi y Panchi por estar conmigo cada vez que lo necesite.

Y en especial a mi amiga Stephanie por su amistad sincera y su compañía durante todos estos años, y por ayudarme a escribir los agradecimientos.