

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

OBTENCIÓN Y CONGELACIÓN DE EMBRIONES DE PERRA (*Canis lupus familiaris*)

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

**MARCELA ALEJANDRA PEIRANO VÁSQUEZ
VALDIVIA – CHILE**

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Nombre

Firma

Nombre

Firma

FECHA APROBACIÓN:

**A JORGE PEIRANO Y MARGARITA VÁSQUEZ,
MIS AMADOS PADRES.**

INDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSIÓN.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32
8. ANEXOS.....	38
9. AGRADECIMIENTOS.....	44

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue inducir superovulación en perras, obtener embriones para ser congelados por el método estándar, y evaluar su sobrevivencia luego de la descongelación.

Se utilizaron 6 perras adultas en anestro, a las que se les indujo superovulación con Extracto Hipofisiario Equino (HAP) y HCG. Después de detectado el estro y ovulación, las perras fueron sometidas a monta dirigida, y a una además se le realizó inseminación artificial con semen fresco. Los embriones fueron recuperados quirúrgicamente entre los 13 y 21 días después de detectada la ovulación mediante ecografía. Estos fueron evaluados y puestos en cultivo *in vitro* por 24 horas. Sólo 5 embriones llegaron al estado de mórula, los que fueron congelados. Luego fueron descongelados y se evaluó su morfología, desarrollo *in vitro* y tinción. Sólo 2 de los 5 embriones congelados fueron descongelados, éstos sobrevivieron al proceso y compactaron luego de 24 horas de cultivo *in vitro*.

Si bien los datos obtenidos son escasos, demuestran que es factible crioconservar embriones de perras, lo que constituye un avance para las biotecnologías reproductivas en caninos.

Palabras clave: congelación, embriones, perra, caninos, superovulación.

2. SUMMARY

RECOVERY AND FREEZING OF CANINE EMBRYOS (*Canis lupus familiaris*)

The objective of this work was to induce superovulation in bitches, to obtain embryos to be frozen by a standard method, and to evaluate their survival after thawing.

Six adult bitches in anestrus were used, to which superovulation was induced with equine hypophysial extract HAP and HCG. After detected the estrus and ovulation, the bitches were submitted to guide mount, and to one also artificial insemination was realized with fresh semen. The embryos were collected surgically between the 13 and 21 days after detected the ovulation by means of an echography. These were evaluated and put in culture *in vitro* for 24 hours. Only 5 of them came to the state of morulae, to which were frozen. Then they were thawed and their morphology, *in vitro* development and staining were evaluated. Only 2 of 5 frozen embryos were thawed, these survived the process, and they compacted after 24 hours of culture *in vitro*.

Although, the obtained information is scarce, results demonstrate that is feasible cryopreservation of embryos, what constitutes an advance for the reproductive biotechnologies in canine.

Keywords: freezing, embryos, bitch, canines, superovulation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. HEMBRA CANINA.

3.1.1. Anatomía Reproductiva.

Los órganos del aparato reproductor femenino son ovarios, oviductos, útero, cuello uterino, vagina y genitales externos. Los órganos genitales internos están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta de mesovario, que sostiene al ovario; el mesosálpinx, que sostiene al oviducto; y el mesonéfron, que sostiene al útero (Hafez 2000^a).

El ovario de la perra está encapsulado por la bursa ovárica, que posee una hendidura bursal localizada centralmente a través de la cual el ovario puede ser visualizado durante el estro, utilizando un endoscopio. Durante el anestro, la hendidura bursal se cierra. Los ovarios de la perra recién nacida contienen un estimado de 700.000 ovocitos que disminuyen a 250.000 a la pubertad, 33.000 a los 5 años de edad, y sólo permanecen 500 hacia los 10 años de edad. Obviamente la mayor parte de estos folículos sufren atresia en diferentes etapas del desarrollo folicular y los ovocitos se degeneran. Después de la pubertad, una ola de folículos se desarrolla con cada estro. Muchos folículos alcanzan un diámetro de 6 mm, pero no todos están destinados a ovular (Pineda 1991).

3.1.2 Fisiología Reproductiva.

El ciclo reproductivo se relaciona con diversos fenómenos: pubertad y maduración sexual, temporada reproductiva, ciclo estral, actividad sexual posparto y envejecimiento. Estos componentes son regulados por factores ambientales, genéticos, fisiológicos, hormonales, conductuales y psicosociales. El grado de fecundidad adquirido al momento de la pubertad se mantiene por unos pocos años antes de declinar gradualmente debido al envejecimiento (Hafez 2000^b).

La perra doméstica, ha desarrollado una fisiología reproductiva que la diferencia de otras especies domésticas, como también de las especies caninas salvajes. Por ejemplo, posee prolongados períodos interestrales (5 a 12 meses), siendo indiferente a la estación del año y al largo del día. La luteinización y la producción de progesterona ocurren antes de la ovulación, y la fase populatoria continúa a pesar del alza de progesterona en la sangre (Corti 2003).

Desde un punto de vista práctico, un animal macho o hembra ha alcanzado la pubertad cuando es capaz de liberar gametos y de manifestar secuencias completas de comportamiento sexual. La pubertad es básicamente el resultado de un ajuste gradual entre la actividad gonadotrópica creciente y la capacidad de las gónadas de asumir simultáneamente la

estereoidogénesis y la gametogénesis (Hafez 2000^b). La pubertad no es un proceso que se completa en forma súbita, aún cuando la iniciación aparente de la actividad sexual en la hembra puede serlo, sino que por el contrario, se desarrolla lentamente desde el estado de inactividad ovárica o testicular hasta la plena capacidad funcional de estos órganos y de sus órganos efectores dependientes, es decir del tracto reproductivo. Dado, entonces, que la pubertad es un proceso de un relativo desarrollo gradual, y por estar influenciado por una serie de factores endógenos y exógenos, su comienzo es variable con las especies, la raza y el individuo (Pineda y del Campo 1970).

En la perra, la pubertad no es sinónimo de madurez sexual, este último término se refiere a la edad reproductiva óptima y se adquiere a partir del segundo o tercer ciclo estral (celo). La máxima performance reproductiva se mantiene hasta los 6 años aproximadamente, momento a partir del cual la fertilidad comienza paulatinamente a disminuir, aunque los ciclos estrales persisten durante toda la vida de la perra, no existiendo en ellas equivalente a la menopausia de la mujer (Pineda 1991).

La perra es considerada monoéstrica no estacional ya que sólo tiene un celo por estación reproductiva (Intervet 1999). Durante cada ciclo estral, la perra tiene prolongadas fases folicular y lútea, comparadas a las de las especies cíclicas de animales de granja. Contrariamente a la norma en las especies animales de granja, la perra ovula al principio del estro y libera ovocitos primarios. La ovogénesis se extiende alrededor de dos meses después del nacimiento, mientras que en animales de granja, la ovogénesis concluye en el momento del nacimiento. La vida de los cuerpos lúteos de la perra es aproximadamente igual en la perra preñada o no preñada, y el útero no parece ejercer una función discernible en la regresión de los cuerpos lúteos del ciclo (Feldman y Nelson 2000).

El tamaño de la camada es excesivamente variable, en especial entre razas. Algunas razas Toy o Miniatura tienen camadas de uno a tres cachorros, mientras que las perras grandes, como el Setter, puede tener camadas de 10 a 15 cachorros. Considerando todas las razas, una camada de cinco a ocho cachorros sería probablemente el promedio (Pineda 1991).

El ciclo estral de la perra se puede dividir en cuatro fases: un período de inactividad sexual (anestro), de duración variable (promedio: 75 días), le sigue el proestro, de duración promedio: 9 días (2-27 días), que se identifica por edema vulvar y descarga sanguinolenta. El estro, o período durante el cual la hembra aceptará al macho, es la tercera fase, produciéndose la ovulación de forma espontánea al comienzo de esta fase del ciclo, que dura en promedio 9 días (3-21 días). Si no tiene lugar la gestación, el estro va seguido del diestro (promedio: 90 días), que acaba de forma imperceptible en el anestro (Corti 2003).

Para la perra, el proestro es el principio del período de actividad sexual. El inicio del

proestro se establece en forma gradual en una serie de cambios secuenciales anatómicos y conductuales inducidos por estimulación gonadotrópica, y subsecuente desarrollo folicular e influencias estrogénicas ejercidas durante el final del anestro. En general se acepta que el primer día de sangrado representa el primer día del proestro. A medida que la perra se acerca al estro, la vulva se distiende de manera evidente. Durante el proestro, la perra tiende a estar excitable, inquieta y puede perder el apetito; en general se incrementa la ingestión de agua y tiende a orinar frecuentemente. Las perras se vuelven atractivas para los machos. Las feromonas liberadas en las secreciones vaginales y la orina estimulan y atraen al macho. Durante el proestro, la perra no aceptará al macho para apareamiento y puede aun ser agresiva con él. A medida que se acerca el estro, se vuelve más receptiva, y las perras experimentadas sexualmente pueden permitir la monta del macho. El proestro se extiende desde el primer día de sangrado de la vulva hasta el primer día de aceptación del macho para apareamiento (Feldman y Nelson 2000).

El estro, es el periodo de receptividad sexual, se determina de manera confiable por la aceptación de la perra al macho para el apareamiento. Se considera estar en estro cuando acepta, se presenta y forma con éxito el vínculo copulatorio con el macho. Puesto que la liberación de feromonas en este momento es máxima, no es raro observar perros, atraídos de calles a la redonda, esperando a la perra. A medida que el estro progresa, el edema vulvar se vuelve menos notorio, y el sangrado más acuoso, de color rojizo o amarillento (Pineda 1991).

El diestro empieza con el rechazo de la perra a cruzarse y es la etapa del ciclo en la cual los cuerpos lúteos son totalmente funcionales. Hacia el final del estro, algunas perras pueden rehusarse al apareamiento con el macho un día, pero aceptarlo al día siguiente. Esto se observa frecuentemente en perras jóvenes, en particular cuando el macho es persistente y agresivo. Debido a ésta conducta, es aconsejable considerar a la hembra en diestro cuando rehúsa el apareamiento dos días consecutivos. Durante las etapas iniciales del diestro, la distensión vulvar y la descarga vaginal disminuyen rápidamente y la perra se relaja más a medida que progresa en el diestro. Puesto que la perra ovula mientras se encuentra en estro, el metaestro, definido como el periodo de formación y el inicio de secreción de progesterona por los cuerpos lúteos recién formados, se presenta en su totalidad durante el periodo de estro (Intervet 1999).

El anestro sigue al diestro. Esta etapa del ciclo se caracteriza como periodo de inactividad sexual entre ciclos y se definía como lapso de inactividad ovárica. Esta definición ya no es sostenible puesto que hoy se sabe que los ovarios de la perra están bastante activos y sensibles a estimulación gonadotrópica endógena, semanas antes del siguiente proestro (Intervet 1999).

3.1.3 Embriología.

Después de la ovulación y la fertilización, el embrión permanece en el oviducto un largo tiempo, donde puede sobrevivir varios días, en comparación con otras especies, 8-10 días en la perra, en comparación con el cerdo que solo permanece 2 días, 3-4 en la vaca y ratón. Ya que

el periodo de desarrollo es lento y la implantación es larga, produciéndose a los 18-20 días (Reynaud y col 2006).

La ovulación ocurre 24-48 horas después del pico de LH y el intervalo entre la cópula y la ovulación es altamente variable, produciéndose la ovulación 5 días antes hasta 3 días después de comenzado el estro (Reynaud y col 2006).

Después de la fertilización los ovocitos fertilizados son transportados a la sección media de los oviductos donde comienza la segmentación después de 72 horas, a las 96, 120, 144, 168 y 192 horas los huevos están en estadio de 2, 2-5, 8, 8-16 y 16 células respectivamente, en la sección distal del oviducto. A las 204-216 horas los huevos son transportados al útero como mórula (Christiansen 1989^b).

Los espermatozoides pueden sobrevivir largo tiempo en el tracto genital de la perra, encontrándose espermatozoides móviles transcurridas 268 horas del apareamiento. (Christiansen 1989^a).

La migración embrionaria, aún no está clara en el perro, pero se sabe que los embriones se distribuyen equitativamente en cada cuerno uterino (Tsutsui y col 2002).

3.1.1. Maduración del ovocito.

El ovocito es liberado en estado de vesícula germinal (VG), y la meiosis se reanuda en el oviducto después de 48 horas (Reynaud y col 2005). El ovocito requiere 48-72 horas para completar la maduración meiótica, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Hatoya y col 2006). Además, el entorno endocrino en la ovulación en la perra, es diferente a las otras especies, se produce una luteinización de algunos folículos preovulatorios después del pico de hormona luteinizante (LH), y la progesterona ya ha alcanzado niveles séricos altos al momento de la ovulación (Reynaud y col 2005).

La determinación precisa de la cronología es de suma importancia para las biotecnologías reproductivas en caninos, especialmente para seleccionar el momento óptimo de la inseminación artificial con semen congelado o transferencia de embriones. En estudios previos, el tiempo de ovulación no ha sido totalmente definido y el desarrollo embrionario estaba evaluado en relación al momento del pico LH o el nivel de progesterona, o fue observado por laparoscopia (Tsutsui y Shimizu 1975, Archbald y col 1980, Bysted y col 2001). La determinación del estadio nuclear en ovocitos caninos con microscopía y tinción del ADN (Tsutsui y Shimizu 1975) o con microscopía de fluorescencia (Saint-Dizier y col 2004) es muy difícil y incierta, debido al alto contenido de lípidos intracitoplasmáticos, los que le dan un color oscuro al ovocito y embrión. Sin embargo, han surgido avances en las

técnicas de observación, como la inmunohistoquímica, pero requiere de material y equipamiento adecuado (Reynaud y col 2006).

La determinación del momento de la ovulación se puede realizar mediante la medición de concentraciones plasmáticas de hormonas, como la LH y Progesterona, pero resulta un método engorroso y caro, para lo cual hoy disponemos de medios como la ultrasonografía, que resulta más sencilla y eficaz, pero requiere de al menos tres observaciones diarias (Reynaud y col 2006)

3.2. INDUCCIÓN DE ESTRO EN PERRAS.

Diversos métodos para inducir celo y ovulación en perras, se han desarrollado en el último tiempo, esto se debe en gran parte a la necesidad terapéutico-reproductiva que se ha presentado en la actualidad en las perras (acortamiento del anestro patológico y fisiológico). Ello hace fundamental la intervención del Médico Veterinario en la necesidad de poder acortar los períodos interestrales prolongados y estimular el retorno al celo en perras cuyo ciclo estral haya sido suprimido hormonalmente (Corti 2003).

En los primeros experimentos reportados en perras, se utilizaron inyecciones de extracto urinario de hembras preñadas, con resultados que variaron desde la manifestación de algunos a todos los signos clínicos externos de estro (Feldman y Nelson 2000). Luego se probó con gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH) y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), administrándose por separado o en combinación, con resultados variables (Versteeger y col 1997).

La inducción de ciclos y la reducción del intervalo interestro en la perra pueden realizarse mediante varias alternativas. La primera alternativa incluye la utilización de una combinación de gonadotropinas (eCG y HCG O hMG), gonadotropinas de la pituitaria (FSHy LH) o dietilestilbestrol y FSH. La segunda alternativa incluye la utilización de GnRH y sus agonistas (buserelina y cistorelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina), para estimular la liberación de hormonas gonadotrópicas endógenas de la hipófisis. Otra alternativa incluye la utilización de prostaglandinas para inducir luteólisis y acortar el diestro. También se puede terminar el anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina) que actúan inhibiendo la prolactina y acortando así los períodos interestrales (Stornelli y col 2006).

El dietilestilbestrol (DES) también se ha usado para la inducción de ciclos estrales. Sin embargo, con el uso de estrógenos siempre se debe considerar la potencial aparición de piómetras, neoplasias mamarias y otros problemas genitales (Gobello 2001).

El extracto hipofisiario equino (HAP), es un producto crudo obtenido de hipófisis equinas provenientes de matadero, tiene efectos gonadotróficos (FSH y LH) con lo que es posible inducir desarrollo folicular y ovulación (Gatica 1985). Como no existe un producto comercial de este extracto, sólo se han podido realizar trabajos experimentales, siendo este producto utilizado para inducir superovulación y ovulación en diferentes especies; Moore y Shelton (1964); Crosby y col (1980), en ovinos. En bovinos ha sido usado por Moore (1975) y Boland y col (1981). Salas (1984) en caprinos. Sciarresi y col (1984) en terneras prepúberes, y Bustamante (1987), Godoy (1998) y Corti (2003) en perras.

3.3. SUPEROVULACIÓN.

El objetivo de la superovulación es inducir en la hembra un número mayor de ovulaciones al que presenta en forma natural, en cada uno de sus ciclos estrales (Araya 1995).

Se ha indicado que las gonadotrofinas estimularían la actividad mitótica en folículos preantrales y antrales pequeños (Monniaux y col 1983), o que actuarían previniendo o interviniendo el proceso natural de atresia (Moor y col 1980, Seidel y Seidel 1982).

Uno de los principales problemas que presentan los tratamientos superovulatorios, es la marcada variación individual en la respuesta que se obtiene al aplicar cualquiera de los tratamientos en uso (Monniaux y col 1983).

Se piensa que esta alta variabilidad estaría determinada por diferentes factores, tales como, aquellos del ambiente y condiciones en que son mantenidas las hembras, de la hormona y el tratamiento empleado en la inducción de superovulación, o aquellos propios del animal (Murphy y col 1987).

Se ha señalado como factor importante de variación ovulatoria la diferente población folicular presente en los ovarios de las hembras al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio (Monniaux y col 1983), así como la diferente sensibilidad ovárica a iguales niveles de gonadotrofinas (Gordon 1982).

Desafortunadamente, no se tiene un tratamiento hormonal que proporcione respuestas uniformes en términos de número de ovulaciones, calidad de ovocitos liberados, número y viabilidad de ovocitos fecundados (Moor y col 1984).

Investigaciones futuras orientadas a la evaluación de los diversos protocolos de inducción, así como de las dosis y periodos de administración utilizados permitirán alcanzar mejores resultados en la inducción de ciclos fértiles, lográndose altas tasas de ovulación y de preñez evitando efectos

colaterales indeseables en la madre (Stornelli y col 2006).

3.4. OBTENCIÓN DE EMBRIONES.

Los embriones pueden extraerse de oviductos o úteros después de sacrificar a la hembra o por la extracción del aparato reproductor, o bien pueden recolectarse por medios quirúrgicos o no quirúrgicos del animal intacto.

3.4.1. Métodos quirúrgicos.

Aunque hay diferencias menores en las técnicas aplicadas a cada especie, el método básico para la recuperación quirúrgica de embriones es similar en todas las especies (Bowen y Pineda 1991).

La recuperación quirúrgica de embriones se lleva a cabo mejor con la donadora bajo anestesia general. Se hace una laparotomía y se exteriorizan ovarios y cuernos uterinos para lavarlos a través de una incisión en la línea media. Después de la recuperación de los embriones, el tracto reproductivo se vuelve a colocar en la cavidad abdominal y la incisión se cierra de manera estándar (Bowen y Pineda 1991).

La mayor desventaja de los métodos quirúrgicos para la recuperación de embriones es la inducción casi inevitable de adherencias periováricas, que pueden reducir la fertilidad subsecuente. Además del riesgo que conlleva la anestesia general (Bowen y Pineda 1991).

Tsutsui y col (2000), utilizó perras donantes que fueron apareadas una vez al día, los días 2 a 5 después de la ovulación. Los días 8 a 11 después de la ovulación (los días 4–7 después de la cópula), ambos oviductos y el cuerno uterino fueron removidos quirúrgicamente bajo anestesia general. Los oviductos y los úteros removidos fueron lavados para recobrar los embriones. Otros perros fueron sometidos a laparotomía 10 o 11 días después de la ovulación (8 o 9 días después de la cópula). Los cuernos uterinos fueron lavados hacia abajo. Con una aguja de 21G conectada a una jeringa de 5 ml., fue introducida en la punta del cuerno uterino y 5 ml. de medio de lavados fueron inyectados hacia abajo (el método quirúrgico). El medio de lavado usado para la recuperación de los embriones fue una solución Ringer suplementada con 20% de suero canino.

3.4.2. Métodos no quirúrgicos.

Se ha utilizado una variedad de instrumentos para la recuperación no quirúrgica de embriones; uno de los más exitosos es un catéter de Foley, que está hecho de látex flexible y tiene tres canales: uno para inflar el globo cerca de la punta del catéter y dos para la afluencia y colecta del medio de lavado. Se maniobra con el catéter a través del cérvix, el globo se infla

justo cerca de la bifurcación uterina, y se irrigan los cuernos uterinos por separado. Una vez que el cuerno está irrigado, se desinfla el globo y el catéter se coloca en el otro cuerno uterino. El medio utilizado para irrigar alimenta a través del canal de afluencia del catéter por flujo de gravedad de un recipiente suspendido, y el cuerno uterino se distiende hasta que se vuelve turgente. Entonces se interrumpe la afluencia, se abre el canal de desagüe y permite que el fluido acumulado drene hacia un cilindro de recolección. Se han observado pocos efectos adversos en este tipo de recuperación no quirúrgica, sobre la fertilidad de la donadora, después de varias recuperaciones no quirúrgicas (Bowen y Pineda 1991).

Una desventaja importante de la recuperación no quirúrgica, es que los embriones que se encuentran aún en el oviducto en el momento de la recolección no pueden ser recolectados (Bowen y Pineda 1991).

3.5. CRIOCONSERVACIÓN.

La crioconservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos (Cabodevila y Teruel 2001). El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras, incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie, transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia, controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales vivos por la de embriones congelados libre de ellas, crear bancos de embriones de alto valor genético, entre otros (Celestinos 2003). Desde el punto de vista práctico, la principal ventaja de la congelación de embriones, es que permite economizar y aumentar el rendimiento del uso de receptoras, aspecto que significa la mayor inversión en la industria de la transferencia de embriones (Boggio 2002).

Otra ventaja es que el trabajar con embriones congelados, la transferencia es independiente del tiempo, no se necesitan sincronizar receptoras y además permite controlar la época de partos (Boggio 2002).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196°C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc., es decir, reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula. Así es posible almacenar embriones durante un largo periodo sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos (Celestinos 2003). Leibo (1989) identifica cuatro etapas comunes a las diferentes técnicas: exposición de los embriones a concentraciones molares de agentes crioprotectores, enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas lo suficientemente bajas como para causar un virtual cese de todas las reacciones químicas inducidas térmicamente, calentamiento desde la temperatura de

conservación a temperaturas fisiológicas y finalmente, extracción del crioprotector (Cabodevila y Teruel 2001).

Desde 1972, considerables avances se han logrado en el estudio de muchos mecanismos involucrados en la supervivencia del embrión al congelamiento y descongelación, estos estudios han incluido curvas de enfriamiento, temperaturas de seeding e inmersión en nitrógeno líquido (N_2L), tasas y temperaturas de descongelación, tipo, concentración y métodos de exposición a crioprotectores, efectos tóxicos, protectores, producción de anomalías cromosómicas, inducción de fusión de membrana celular, efectos de agregado de diferentes sustancias al medio y electrolitos en la solución de congelación (Boggio 2002).

Entre otros factores se ha estudiado el potencial tóxico de los materiales utilizados (Schiewe y col 1986), métodos de observación y/o evaluación especiales (Massip y Mulnard 1980), maneras de mejorar la retención embrionaria, influencia del genotipo animal y estudios sobre volumetría, conductividad del agua y permeabilidad de los embriones a diferentes sustancias, entre otros (Songsasen y col 1995).

3.5.1. Técnicas de crioconservación.

Las técnicas de crioconservación permiten conservar embriones por distintos periodos dependiendo de las temperaturas que se utilicen (Cabodevila y Teruel 2001).

3.5.1.1. Refrigeración: La refrigeración es un método simple por medio del cual pueden mantenerse embriones a temperaturas entre 0 y 4 °C durante 24 a 72 horas. La refrigeración de embriones se encuentra como un paso intermedio entre la transferencia de embriones en fresco (recién recolectados) y conservados a -196 °C. Es una técnica que permite detener el desarrollo embrionario y mantener la viabilidad embrionaria mediante un simple refrigerador con hielo y agua para regular el descenso de la temperatura (Cabodevila y Teruel 2001).

La técnica se utiliza para transportar embriones cuando las receptoras se encuentran distantes de las donantes y también para conservar embriones hasta que receptoras asincrónicas alcancen la sincronización adecuada. No obstante, a pesar de los buenos resultados y de su sencillez, en la actualidad ha caído prácticamente en desuso debido a que la congelación convencional se ha convertido en una técnica que si bien es mas costosa, permite mantener la viabilidad embrionaria por tiempos ilimitados, con las ventajas practicas que ello trae aparejado (Cabodevila y Teruel 2001).

La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBS (Solución Buffer Fosfato) envasados en pajuelas de 0,25 ml y colocadas en un refrigerador (Celestinos 2003).

3.5.1.2. Congelación estándar: En el método de congelación estándar los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento (Cabodevila y Teruel 2001). La exposición de los embriones al medio de congelación (PBS mas glicerol) debe realizarse a temperatura ambiente (20-22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración. Este periodo incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas. Esto permite realizar más rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o “seeding”. Las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con las del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido; el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido, alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor. Una vez efectuado el seeding, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (periodo de estabilización) y luego se desciende a una velocidad entre 0,1 y 0,5 hasta -30 ó -35 °C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajuelas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido. La descongelación se realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 ó 35 °C durante 20-30 segundos (Celestinos 2003).

3.5.1.3. Congelación rápida: Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándose en una solución mixta de glicerol y sucrosa. Esta segunda deshidratación, deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas en el nitrógeno líquido (Celestinos 2003).

3.5.1.4. Vitricación: La vitricación es un proceso fisico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones (Celestinos 2003). Se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que éstos alcancen su equilibrio osmótico. Es un proceso termodinámico mediante el cual el fluido incrementa su viscosidad durante el enfriamiento, adquiriendo las propiedades de un sólido. A diferencia de lo que ocurre durante la congelación, en la vitricación no se forman cristales, sino que el fluido pasa a un estado sólido no estructurado similar al vidrio de donde la técnica toma su denominación (Cabodevila y Teruel 2001).

La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido no requiere más de 10 minutos (Celestinos 2003).

3.6. CRIOPROTECTORES.

Los crioprotectores disminuyen el punto de fusión de las soluciones, reducen la concentración intra y extracelular de electrolitos y la excesiva deshidratación celular a

temperaturas bajo cero, reducen el hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación e influyen en su forma. También inhiben la actividad de muchas enzimas como catalasa, peroxidasa, α -amilasa, aldolasa, etc. Lo que disminuye o elimina la actividad de radicales libres responsables de la lisis celular, antes, durante y luego de la congelación y descongelación (Celestinos 2003)

Los crioprotectores también estabilizan proteínas celulares, mantienen en equilibrio el potencial químico del agua intra y extracelular, reemplazan las moléculas de agua removidas durante la congelación, bloquean la toxicidad de otros crioprotectores e interactúan con proteínas de la membrana celular, favoreciendo la adaptación de la célula a los cambios del medio (Boggio 2002).

Los crioprotectores se clasifican en dos grupos: a) penetrantes de bajo peso molecular (glicerol y etilenglicol entre otros) y b) no penetrantes, de bajo peso molecular (sucrosa y trehalosa entre otros) o alto peso molecular (ficoll, polivinilpirrolidona y otros) (Boggio 2002).

3.6.1. Crioprotectores penetrantes.

La mayoría son alcoholes. Reemplazan osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento y disminuyen el punto de congelación del agua, lo que combinado a una lenta tasa de enfriamiento disminuye la formación de cristales de hielo. Sus pesos varían entre 32 y 212 Daltons. Algunos son el glicerol (G), dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), etanol y otros alcoholes; todos estos ayudan a proteger el citoplasma (Celestinos 2003).

3.6.2. Crioprotectores no penetrantes.

Por el gran tamaño de sus moléculas no entran a la célula o lo hacen con extrema dificultad; son azúcares y macromoléculas. Reducen las fuerzas iónicas fuera de la célula (Farrant 1969) e influyen en la formación de cristales de hielo. Según el tamaño de la molécula se clasifican en bajo y alto peso molecular (Palasz y del Campo 1995).

Los de bajo peso molecular son azúcares. Inducen la deshidratación de las células embrionarias antes del enfriamiento, reduciendo la formación de cristales de hielo en la congelación. Sus pesos moleculares son de 150 a 614 Daltons (Boggio 2002).

Los de alto peso molecular son macromoléculas. Protegen los embriones durante el congelamiento y descongelamiento alterando la formación de cristales de hielo intracelular a un tamaño y características tales que no producen daño celular. Sus pesos moleculares son mayores a 1000 Daltons (Boggio 2002).

Para que los crioprotectores no penetrantes expresen al máximo sus características, deben ser mezclados con crioprotectores penetrantes (Palasz y del Campo 1995).

3.7. EVALUACIÓN DE EMBRIONES.

Cualquier técnica en la que se utilicen embriones, incluso la congelación, implica obviamente su evaluación morfológica (Boggio 2002).

Las características morfológicas de los embriones en sus diferentes estadios de desarrollo, fue descrita por Linder y Wrigth (1983), tomando en cuenta esta descripción como base, Palma (2001) clasifica a los embriones bovinos de la siguiente manera:

Estado de desarrollo	Número de blastómeras	Días de desarrollo posfecundación	Cracterísticas generales
Mórula temprana	32-64	5	Blastómeras unidas, ocupan casi todo el espacio perivitelino.
Mórula compacta	32-64	6	Blastómeras unidas, ocupan el 60-70% del espacio perivitelino.
Blastocisto temprano	100-200	7	Aparece el blastocele (cavidad) en el interior del embrión, ocupa el 70-80% del espacio perivitelino.
Blastocisto	más de 200	8	Diferenciación evidente entre trofoblasto y el macizo celular interno. Ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
Blastocisto expandido	200-800	9	El diámetro del embrión aumenta considerablemente, se adelgaza la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original.
Blastocisto eclosionado	200-800	10-11	Los embriones salen de la zona pelúcida, pueden tener forma esférica y tiene un blastocele bien definido o colapsado.

La evaluación de embriones después del proceso de crioconsecvación es una herramienta importante para estimar si la técnica utilizada fue la adecuada. Los aspectos importantes que se deben tener en cuenta son: forma del embrión, color, textura del macizo celular, número y compactación de las blastómeras, extrusión celular, si hay indicios de degeneración (vesiculación), presencia e integridad de la zona pelúcida (Palma 2001).

La supervivencia se puede evaluar a través del desarrollo de los embriones a estados más avanzados luego de un periodo de incubación (24, 48 y 72 horas) en cultivo *in vitro*, posterior a la crioconservación y calentamiento (Gordon 1994).

Otra técnica para la evaluación de embriones es la tinción fluorescente y/o supravital (Boggio 2002). Kaidi y col (2001) utilizaron un método de doble-tinción para determinar las alteraciones de la membrana celular. Los dos colorantes eran 1) Propidio Iodado (PI; Sigma), que es un marcador del ácido nucleico que excluye las células intactas; puede incorporarse solamente a las células con la integridad de la membrana alterada (se ve de color rojo a luz ultravioleta); y 2) Bisbenzimidida (BIS; Hoechst 33342; Calbiochem), la cuál incorpora todas las células y altamente específico y cuantitativo para el DNA (se ve de color azul a luz ultravioleta). En células con alteraciones de la membrana, la fluorescencia de la Bisbenzimidida es apagada por el Propidio Iodado, que absorbe la energía y emite fluorescencia roja. La doble tinción es particularmente conveniente para determinar lesiones de la membrana en células embrionaria.

Otro método para determinar viabilidad, es la evaluación de la morfología y calidad del embrión luego de la vitrificación y calentamiento. Esto indica que un embrión que reexpanda y tenga una buena calidad luego de ser cultivado *in vitro*, será considerado viable (Gordon 1994). La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), ha establecido una pauta internacional para la clasificación y la evaluación de embriones por su calidad. En ésta se establece como calidad 1 los embriones excelentes, calidad 2 para embriones buenos, calidad 3 para embriones regulares y calidad 4 para embriones malos (Thibier 2000).

Palma (2001), describió la siguiente morfología para la evaluación de embriones:

Calidad embrionaria	Características
Excelentes	Blastómeras simétricas, sin ninguna evidencia de degeneración celular y la zona pelúcida intacta.
Buenos	Presentan pocas granulaciones, algunas células degeneradas, zona pelúcida intacta.
Regulares	Poseen un grado de asimetría de las blastómeras. Más células degeneradas que en el grado anterior, zona pelúcida intacta, pero puede presentar un ligero agrietamiento. Forma irregular.
Malos	Poseen marcada degeneración celular y la zona pelúcida está seriamente afectada. Asimetría de las blastómeras con marcada vesiculación.

3.8. HIPÓTESIS.

Es posible obtener y congelar embriones caninos.

3.9. OBJETIVOS.

3.9.1 Objetivo general.

Obtener embriones de perra mestizas adultas y establecer un método de crioconservación aplicable en las biotecnologías reproductivas de los caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*).

3.9.2. Objetivos específicos.

- Inducir superovulación con y celo con HAP y HCG en perras mestizas adultas.
- Obtener embriones mediante lavado del tracto reproductivo *in vitro*.
- Evaluar a través del estado de desarrollo y calidad de los embriones obtenidos, mediante su morfología.
- Criopreservar embriones mediante congelación estándar.
- Evaluar la calidad y desarrollo en cocultivo de los embriones después de la descongelación, mediante desarrollo *in vitro*, morfología y tinción.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Animales experimentales.

Se utilizaron 6 perras adultas mestizas, entre 10 y 15 kilos con una condición corporal de 2,0 a 2,5 (en escala de 1 a 5), provenientes del Programa de Eutanasia Voluntaria del Ministerio de Salud de Valdivia, entre 1,5 y 3 años de edad determinado por cronometría dentaria y anamnesis, clínicamente sanas y en estado de anestro clínico, el cual fue confirmado por citología vaginal. Se les realizó un examen clínico para determinar el estado general y la normalidad del tracto reproductivo.

Las perras fueron mantenidas durante el estudio en dependencias del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, en caniles construidos y acondicionados para este estudio.

Se utilizaron 5 machos adultos mestizos, de distinta procedencia. Se les realizó un examen clínico reproductivo, a través de la inspección y palpación de los genitales, para constatar la presencia e integridad de los testículos, epidídimos, escroto, prepucio y pene.

4.1.2.- Material hormonal.

Extracto Hipofisiario Equino (HAP): elaborado en el Instituto de Reproducción Animal, de la Universidad Austral de Chile, siguiendo el método descrito por Moore y Shelton (1964) (Anexo 1), con la modificación de utilizar la hipófisis completa. Este extracto fue probado en ratones Rockefeller, antes de ser utilizado en las perras,

Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG)*

4.1.3. Material para citología vaginal.

- Portaobjetos.
- Tórulas.
- Alcohol Metílico.
- Tinción Giemsa.
- Microscopio Olympus CX31

* Chorulón ®; Laboratorio Intervet.

4.1.4. Material para ecografía.

- Ecógrafo Pie Medical 240 Parus, Transductor 402155 7.5 MHZ IR MAP SC24
- Gel conductor para ecografía.

4.1.5. Material para recuperación de embriones.

- Dulbecco (Anexo 2) con 2% de suero sanguíneo de perra, más antibiótico (Gentamicina).
- Bránulas 24 G.
- Placas Petri.
- Lupa estereoscópica.

4.1.6. Material para el cultivo de embriones.

- TCM199 (con 25mM de Hepes).
- Piruvato de sodio.
- Sulfato de gentamicina.
- Suero fetal bovino.
- Monocapas de Células de la Granulosa de Bovino, producidas en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile.

4.1.7. Material para la congelación de embriones.

- Dulbecco (Anexo 2).
- Suero fetal bovino (SFB)
- Etilenglicol.
- Pajuelas francesas de 0,25 ml.
- Maquina de congelación FHK Program Freezer ET-1N.
- Tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido.

4.1.8. Material para la descongelación de embriones.

- TCM199 (suplementado con 25 mM de Hepes) más Sacarosa (Anexo 3).
- Suero fetal bovino.
- Sulfato de Gentamicina.

4.1.9. Material para la evaluación de embriones.

- Lupa estereoscópica.
- Microscopio invertido Nikon DIAPHOT Phase Contrast ELWD 0.3.
- Microscopio de epifluorescencia LEICA DMLB.
- Tinción de fluorescencia (Anexo 4).

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Inducción de celo y ovulación.

El preparado de HAP, previamente suspendido en 2 ml de suero fisiológico, se administró a las hembras en dosis de 20 mg, vía subcutánea, diariamente, durante 10 días. El día 11 ó cuando se observó un 100% de células cornificadas, se le aplicó una dosis única de 1000 UI de HCG vía intramuscular coincidiendo con lo utilizado por Bustamante (1987) y Corti (2003).

Se realizó citología vaginal todos los días a cada perra, para determinar si las hormonas aplicadas estaban haciendo efecto. A partir del día 6 ó 7 de aplicada la HAP, se realizó una ecografía diariamente a cada una de las perras, para determinar el momento de la ovulación, en donde se apreciaba el desarrollo folicular y su ruptura (Figura 1), y se determinó el día de la ovulación, como el día en que se dejaron de apreciar ecográficamente los folículos.



Figura 1. Ecografía realizada en el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad austral de Chile. A: ovarios con folículos a los 10 días de tratamiento con HAP. B: Ovarios sin folículos a las 24 horas de aplicación de la HCG.

4.2.2. Monta dirigida de las perras.

Las perras con indicio de estro citológico fueron presentadas con machos enteros, 2 días después de detectada la ovulación mediante ecografía, se procedió a dejar que fueran montadas por el macho disponible, con una monta al día, cada 48 horas por 3 veces.

Una perra que sólo se dejó montar una vez, se le hizo inseminación artificial con semen fresco al día subsiguiente.

4.2.3. Remoción del tracto reproductivo.

Entre los días 13 y 21 después de la ovulación, las hembras fueron sometidas a cirugía bajo anestesia general, para extraer ovarios, oviducto y útero. La cirugía fue realizada en el Pabellón de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, y los tractos fueron transportados hasta el laboratorio en placas con suero fisiológico y antibiótico a 37°C.

Para la recuperación de los embriones, por razones prácticas, se separaron los ovarios (Figura 2 A) de los cuernos, y además se separaron los cuernos a nivel del cuerpo uterino, y así poder lavar cada oviducto y cuerno por separado, para determinar donde se encontraban físicamente los embriones.

Para recuperar los embriones se infundió suero fisiológico con 2% de suero sanguíneo de perra con una bránula 24G, que fue infundido desde el oviducto y luego al cuerno. El suero infundido fue recolectado en un vaso colector (Figura 2 B)

Posteriormente, el medio obtenido fue observado bajo lupa estereoscópica para determinar la presencia de embriones, evaluar el sitio donde se encontraban y determinar estado de desarrollo y calidad de los embriones.

Los embriones de calidad excelente que estaban entre 2, 4 y 8 células, fueron puestos en medio de cultivo (Anexo 5) con monocapas de células de la granulosa de bovino por 24-48 horas, para evaluar si desarrollaban a estado de mórula.

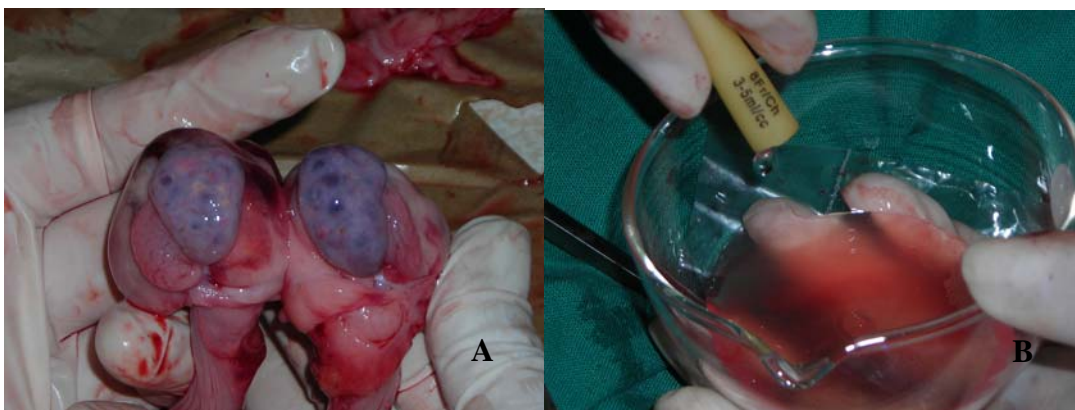


Figura 2. A: ovarios de perras posterior a la OVH, y con la bursa ovárica abierta.

B: Vaso colector, con el líquido recuperado del lavado oviductal y uterino.

4.2.4. Congelación de embriones.

Los embriones en estado de mórula, fueron puestos en una solución de Dulbecco con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) y 0,5 M de Etilenglicol por 5 minutos, luego fueron traspasados a una solución de Dulbecco con 10% de SFB y 1 M de Etilenglicol por 5 minutos y luego a otra solución de Dulbecco con 10% de SFB y 1,5 M de Etilenglicol por 5 minutos y envasados en una pajuelas francesas de 0,25 ml., para ser puestos en la máquina de congelación a 18°C, donde se empezó a disminuir la temperatura a razón de 1°C/minuto hasta -7°C, donde se mantuvieron por 10 minutos, y a los 5 minutos se le realizó el seeding, transcurridos los 10 minutos, se comenzó a disminuir la temperatura hasta -35°C a razón de 0,3°C/minuto, permanecieron a -35°C durante 15 minutos, para luego ser conservados en nitrógeno líquido a -196°C, hasta su descongelación, meses después de ser congelados (Figura 3). Esta curva de congelación fue la utilizada en el proyecto FIA-PI-C-2004-1-P-O47 “Centro Tecnológico de Reproducción de Ovinos de Alta Calidad”.

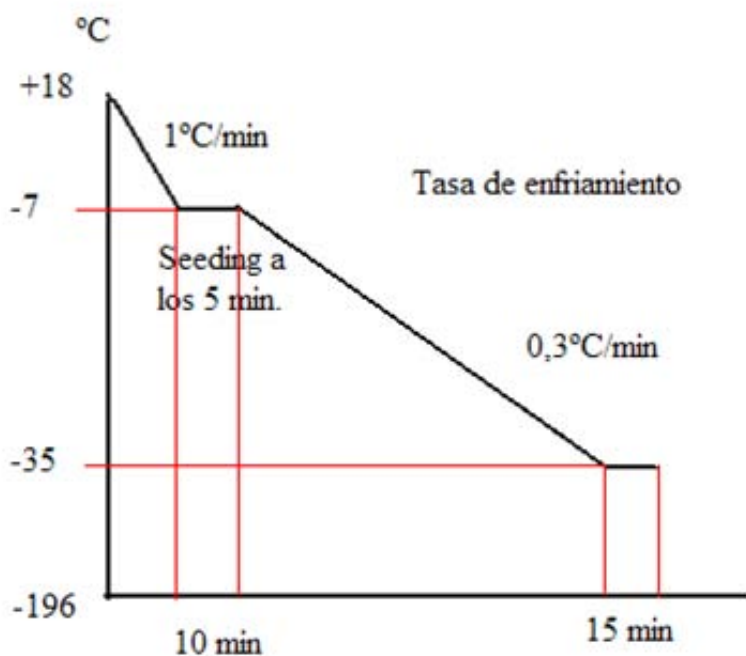


Figura 3. Esquema de la curva de congelación utilizada (proyecto FIA-PI-C-2004-1-P-O47 “Centro Tecnológico de Reproducción de Ovinos de Alta Calidad”)

4.2.5. Descongelación de embriones.

Los embriones fueron sacados del tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido, expuestos al aire por 20 segundos y luego sumergidos en agua tibia a 25°C por 30 segundos;

pasado este tiempo, se sacó la pajueta del agua, se secó, se cortó y se dejó caer el contenido con el embrión a una placa Petri. Se buscaron los embriones bajo lupa estereoscópica.

Encontrados los embriones, fueron traspasados a una solución con TCM199 (con 25 mM de Hepes) más 1M Sucrosa y 20% de suero fetal bovino y se dejaron ahí por 5 minutos; luego fueron traspasados a una solución de lavado que contenía TCM199 (con 25 mM de Hepes) más 10% de SFB, después de ser lavados 3 veces en esta solución, fueron puestos en medio de cultivo (Anexo 5) con monocapas de las células de la granulosa de bovino por 24 horas a 38,5°C, 5% CO₂ y humedad controlada.

4.2.6. Evaluación de embriones descongelados.

Los embriones fueron evaluados por morfología, desarrollo *in vitro* y tinción de fluorescencia.

La primera evaluación fue realizada a los 3 minutos de permanecer en la solución de calentamiento (Anexo 3), en la cual se evaluó la rehidratación de los embriones e integridad de la zona pelúcida, bajo lupa estereoscópica 3,5X.

Luego de 4 horas en medio de cultivo (anexo 5), se evaluó la reexpansión de los embriones, integridad de la zona pelúcida, forma del embrión, color de las blastómeras y homogeneidad de las blastómeras.

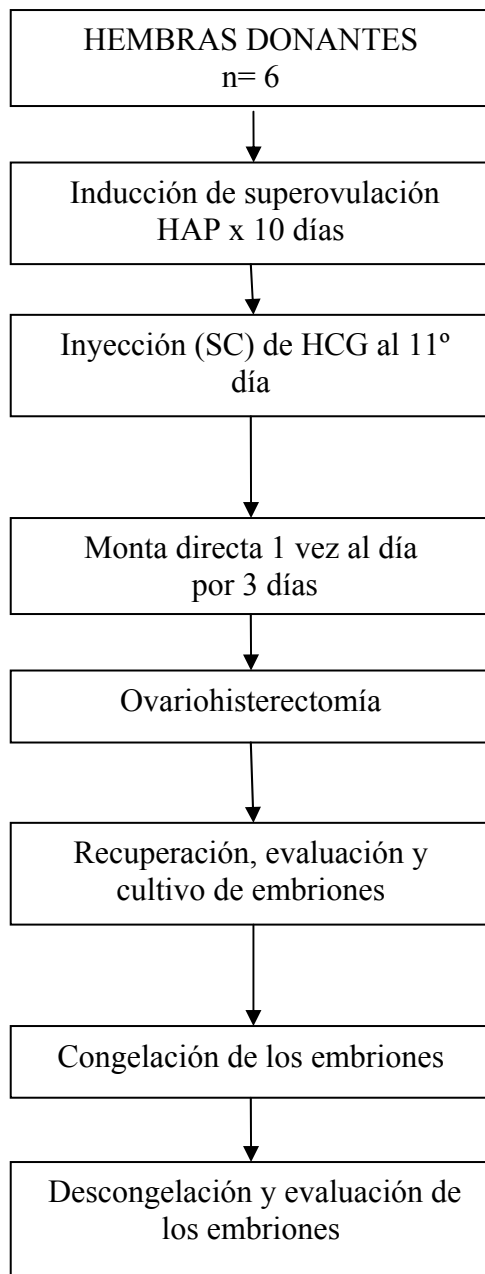
Después de transcurridas 24 horas en medio de cultivo con células de la granulosa de bovino, se evaluaron los embriones bajo microscopio invertido 200X, evaluando la integridad de la zona pelúcida, forma del embrión, color de las blastómeras y presencia de blastómeras desprendidas.

Finalmente, se realizó doble tinción de fluorescencia (Anexo 4), para evaluar número total de blastómeras y diferenciar entre células vivas y muertas.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron presentados utilizando la estadística descriptiva.

4.4. ESQUEMA DE TRABAJO.



5. RESULTADOS

5.1. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON HAP.

En las 6 perras sometidas al tratamiento con HAP, se obtuvo un promedio de inicio de estro a los 11 días, confirmado por citología vaginal. El día de la ovulación fue constante y se produjo a los 12 días. La primera monta, fue en promedio a los $2,1 \pm 1,2$ días y la recuperación de los embriones fue realizada a los $17,5 \pm 3$ días, después de detectada la ovulación mediante ecografía. El número de ova recuperadas (embriones y ovocitos no fecundados), fue en promedio $11,8 \pm 3,9$ (Tabla 1).

Tabla 1. Monta y recuperación de ova en 6 perras inducidas con HAP y HCG.

Perra	Día primera monta desde la ovulación	Día recuperación embriones	Nº Ova recuperadas
1	3	21	14
2	4	18	9
3	1	18	16
4	2	15	6
5	2	20	11
6	1	13	15
X±D.E.	$2,1 \pm 1,2$	$17,5 \pm 3,0$	$11,8 \pm 3,9$

X: promedio; D.E.: Desviación Estándar

5.2. RECUPERACIÓN DE EMBRIONES Y CULTIVO *IN VITRO*.

En la recuperación de ova se observó que todos se encontraban en el oviducto, independiente del día en que fueron recuperados, encontrándose ovocitos no fecundados, embriones de 2 hasta 8 células, siendo la mayoría embriones de dos células. De las 71 ova recuperadas en las 6 perras, sólo 16 (22,5%) estaban sin fecundar, 37 (52,1%) eran embriones de 2 células, 7 (9,8%) eran de 4 células y 11 (15,5%) eran de 8 células (Tabla 2).

Tabla 2. Número y porcentaje de las ova recuperadas, y el estado de desarrollo de los embriones obtenidos.

Perra	N° ova recuperadas	Sin fecundar	Fecundados		
			2 células	4 células	8 células
1	14	2	10	2	-
2	9	9	-	-	-
3	16	1	14	1	-
4	6	2	4	-	-
5	11	2	9	-	-
6	15	-	-	4	11
N° (%)	71	16 (22,5)	37 (52,1)	7 (9,8)	11 (15,5)
			55 (77,5)		

N°: Número; %: porcentaje.

De los 55 embriones recuperados, solo 45 fueron cultivados *in vitro*, que corresponden al 81,8%, ya que poseían calidad excelente y buena. El 18,2% eran de calidad regular y mala, los cuales fueron eliminados (Tabla 3).

Tabla 3. Estado de desarrollo y la calidad de los embriones recuperados.

N° de células del embrión	Calidad excelente y buena	Calidad regular y mala	Total de embriones
2	30	7	37
4	4	3	7
8	11	0	11
Total (%)	45 (81,8)	10 (18,2)	55 (100)

%: porcentaje.

De los 45 embriones cultivados, sólo 5 desarrollaron al estado de mórula, y los otros no siguieron su desarrollo. Estos 5 embriones en estado de mórula fueron congelados por varios meses.

5.3. EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES DESCONGELADOS.

De los 5 embriones congelados, 2 fueron evaluados luego de ser descongelados. Los otros 3 embriones fueron extraviados en el tanque de N₂L.

Luego de ser descongelados los embriones fueron evaluados en medio de descongelación bajo lupa estereoscópica 3,5X, encontrándose morfológicamente normales. La zona pelúcida estaba intacta y las blastómeras se observaron compactas y unidas, sin haber desprendimiento de ninguna de ellas (Figura 4).

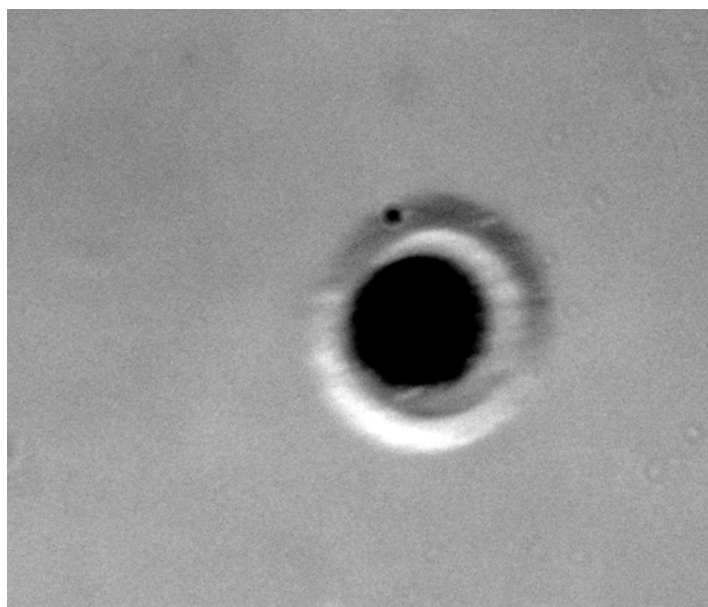


Figura 4. Embrión de perra 3 minutos después de la descongelación.

Luego de permanecer los embriones en cultivo por 4 horas, se observaron en microscopio invertido a 200X, observándose una buena reexpansión de las células, se apreciaron redondos y se observó una uniformidad en el color de las blastómeras (oscuras), la zona pelúcida se encontraba intacta y no se observaron desprendimiento de blastómeras (Figura 5).



Figura 5. Embrión de perra, rehidratado, luego de 4 horas en cultivo después de la descongelación.

Pasadas 24 horas en cultivo con células de la granulosa de bovinos, los embriones fueron evaluados en microscopio invertido a 200X, se observó mórula compacta, la zona pelúcida se encontró intacta, presentaban una morfología normal y sin desprendimiento de blastómeras (Figura 6).

Posteriormente se realizó la doble tinción de fluorescencia.

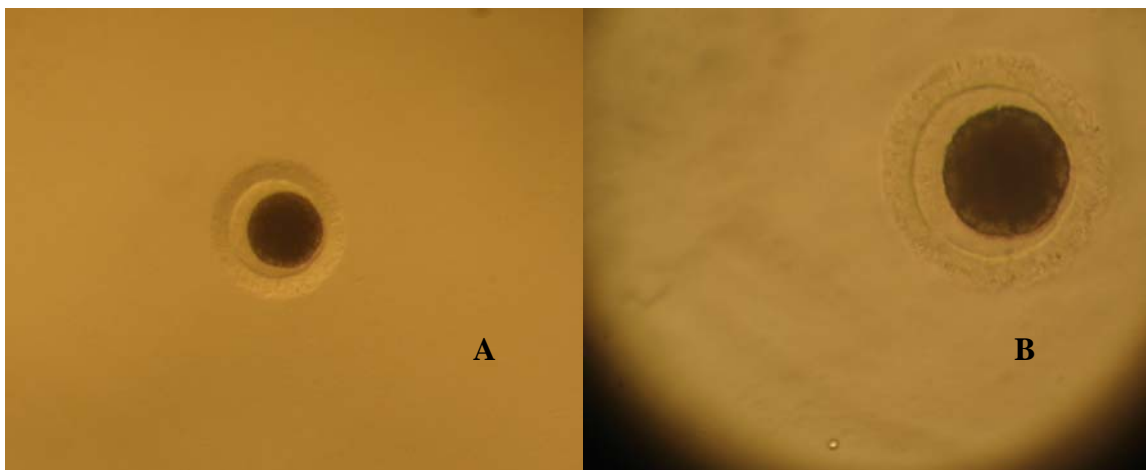


Figura 6. Embriones a las 24 horas en cultivo. A: 100X; B: 200X

6. DISCUSIÓN.

6.1 RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON HAP.

Para la evaluación del tratamiento con HAP, se realizó citología vaginal diariamente, y para la determinación de la ovulación se realizaron ecografías a partir del día 6 ó 7 de iniciado el tratamiento con HAP, posibilitando así la observación de detalles anatómicos, cambios morfológicos-evolutivos de las distintas partes del aparato reproductor de la perra, particularmente el desarrollo folicular y ocurrencia de ovulaciones a través de un seguimiento seriado. Lo anterior confirma lo planteado por Wallace y col (1992) sobre la observación del tracto reproductivo de la perra en celo.

El comienzo del estro en las 6 perras fue a los 11 días, lo que corresponde a lo reportado por Corti (2003), quien obtuvo una presentación de estro entre los 10 a 14 días, utilizando un protocolo igual al utilizado en este trabajo.

La ovulación en las 6 perras fue detectada a las 24 horas de aplicada la HCG, lo que concuerda con lo reportado por Wildt y col (1979), quien informa que la ovulación ocurre entre las 24 y 72 horas después del pico de LH.

6.2. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE EMBRIONES.

Si bien, se recuperaron ova en la totalidad de las perras, es importante mencionar, que la técnica requiere de destreza y entrenamiento para realizarla adecuadamente. Igualmente se necesita un amplio conocimiento de la anatomía de la bursa ovárica y hendidura bursal, además de contar con el material apropiado para el procedimiento.

Se recuperaron 71 ova en diferentes estados de desarrollo. El tiempo de colecta estuvo entre los 13 y 21 días posterior a la ovulación, basado en Hatoya y col (2006), quienes reportaron que los ovocitos de perra que son ovulados, requieren de un periodo de 24 a 72 horas para ser fecundados, por lo que se puede inferir que los embriones recuperados en este trabajo deberían tener entre 12 a 19 días de desarrollo. Debido a que se detectó el día de la ovulación y al compararlo con lo expuesto por Reynaud y col (2006), los que reportan que los embriones a los 4,5-12 días después de la ovulaciones encuentran en estado de 8 células, y Christiansen 1989^a expone que a los 8 días de desarrollo se encuentran en estado de mórula listos para descender al cuerno uterino, se puede deducir, que existe una falta de desarrollo en estos embriones, lo que puede deberse a alteraciones en el momento y/o al tiempo de la

fecundación, ya que la ésta se produce a los 2 a 4 días después de la ovulación (Reunaud y col 2006) , podría existir diapausa como en algunos cérvidos, donde se plantea que pocos días después de la cópula la hembra inicia un proceso denominando diapusa embrionaria o implantación diferida, que consiste en la ralentización del mismo proceso de gravidez, muy similar a una suspensión de la propia gestación, así se evita que las crías nazcan en épocas desfavorables para su desarrollo (Short y Hay 1964), lo que deja una interrogante para ser estudiada en futuras investigaciones en este tema.

De 6 perras se recuperaron 71 ova (fecundadas y no fecundadas), con un promedio de $11,8 \pm 3,9$. Si estos resultados se comparan con lo reportado por Corti (2003) y Bustamante (1987), quienes utilizaron el mismo protocolo de superovulación y recuperación de embriones en perras, obteniendo $20 \pm 9,9$ y $31 \pm 19,6$ ova en promedio (fecundadas y no fecundadas) respectivamente, se puede observar que existe una disminución de las estructuras recuperadas en este trabajo. Estas diferencias observadas, pueden ser explicadas por lo reportado por Monniaux y col (1983), los que manifestaron que la respuesta a los protocolos de superovulación generan respuestas individuales y distintas en cada animal. Además, puede haber una variación entre la cantidad de hormonas presente en la HAP utilizada por Corti (2003), Bustamante (1987) y la utilizada en este trabajo. Araya (1995) realizó un estudio en murinos, ovinos y bovinos, donde observó que la respuesta al tratamiento con HAP es diferente en estas especies, lo que indica, que no en todas la especies este extracto de hipófisis tiene la misma respuesta superovulatoria.

Además, las perras se encontraban en una condición corporal entre 2,0 a 2,5 en una escala de 1-5. La baja condición corporal también puede haber afectado la repuesta al tratamiento de superovulación, ya que en bovinos se reporta que en las hembras en baja condición corporal tiene una baja eficiencia reproductiva (Britt 1992).

6.3. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES.

De las 71 ova recuperadas, sólo 45 embriones fueron puestos en cultivo *in vitro*, de los cuales 5 llegaron a desarrollar al estado de mórula. Estas 5 mórulas coinciden con los embriones que poseían 8 células al momento de la recuperación, que podría ser explicado por lo propuesto por Sreenan y Diskin (1986), quienes reportan que la mayoría de la mortalidad embrionaria se produce dentro de los 10 primeros días posteriores a la fecundación. Cabe destacar que en los perros la activación del genoma embrionario ocurre al estado de 8 células (Reynaud y col 2006), esto explicaría que los embriones que no desarrollaron hasta mórula pueden haber sido afectados por un bloqueo en la expresión del genoma, o que estaban muertos al momento de la recuperación. Rodrigues y Rodrigues (2006) reportan que los resultados de los cultivos *in vitro* de embriones de perro han sido poco exitosos, debido a que los ovocitos pueden haber sido ovulados tempranamente, lo que impediría la adecuada maduración de éstos, también podría deberse a niveles inadecuados de sustancias específicas en los medios de cultivo de embriones, o a la acumulación de toxinas en los medios durante el periodo de cultivo *in vitro*.

6.4. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES.

La congelación de los embriones se realizó según una curva utilizada en ovinos, y los medios fueron adaptados de acuerdo al protocolo utilizado en rumiantes, que se utilizan en el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, ya que no se encontró datos de crioconservación de embriones de perros.

Los 5 embriones congelados presentaban una calidad excelente, de acuerdo a la pauta de Palma (2001) para embriones bovinos. No se encontró en la literatura disponible una categorización para embriones caninos.

Los daños celulares por congelación se influyen principalmente por la formación de cristales de hielo intracelular y el efecto solución, donde el primero es el principal responsable de la muerte celular por congelación, lo que se debe a la deshidratación inadecuada, y el segundo se produce por la separación de los cristales del agua pura del resto de la solución (Celestinos 2003).

Los 2 embriones descongelados presentaron forma y características morfológicas normales a la observación bajo microscopio. Luego de 24 horas de cultivo *in vitro*, los embriones compactaron, lo que es evidencia de viabilidad. No fue posible encontrar en la literatura datos sobre crioconservación de embriones caninos. De esta manera los resultados, si bien son escasos, son los primeros en mostrar viabilidad de embriones caninos congelados por el método de congelación estándar.

No se pudo evaluar el número total de blastómeras y tampoco diferenciar entre células vivas y muertas, mediante doble tinción de fluorescencia, ya que es probable que los colorantes no fueran capaces de penetrar la zona pelúcida, ya que en los ovocitos caninos, estos deben ser fijados y después permeabilizar la zona pelúcida para que puedan atravesar los colorantes (Saint-Dizier 2001), por lo que al estar intacta la zona pelúcida, se presume que los colorantes no fueron capaces de atravesarla.

6.5. CONCLUSIONES.

Es posible inducir estro y superovulación con HAP y HCG en perras, aunque la respuesta superovulatoria puede ser variable.

Es posible obtener embriones de perras superovuladas mediante el lavado *in vitro* del tracto reproductivo de las perras, aunque la anatomía del tracto reproductivo hace necesario un buen entrenamiento previo.

Es posible crioconservar embriones mediante el método de congelación estándar y obtener viabilidad de ellos postdescongelación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Araya JC. 1995. Inducción de superovulación en murinos, ovinos y bovinos utilizando un extracto hipofisiario equino (HAP). Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Archbald L, B Baker, L Clooney, R Godke. 1980. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clinician* 75, 228-238.
- Boggio JC. 2002. Vitricación y congelación convencional de embriones ovinos. Comparación de ambos métodos según sobrevivencia y desarrollo in vitro. *Tesis de Magíster*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Boland M, L Kennedy, T Crosby, I Gordon. 1981. Superovulation in the cow using PMSG or HAP. *Theriogenology* 13 (1),92.
- Bowen RA, MH Pineda. 1991. Transferencia de embriones en animales domésticos. En: McDonald LE. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Mcgraw-Hill, México. Pp 512-541.
- Britt J. 1992. Influence of nutrition and Wright los son reproduction and early embryonic death in cattle. In: *XVII World Buiatrics Congress*. St. Paul, Minnesota, USA, vol 2, Pp 143-148
- Bustamante J. 1987. Uso del Extracto Hipofisiario Equino (HAP), en la inducción de celo en la perras. *Tesis Médico Veterinario*, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Chile.
- Bysted BV, SJ Dieleman, P Hyttel, T Greve. 2001. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil* (suppl) 57, 181-186.
- Cabodevila J, M Teruel. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: Palma A. *Bioteología de la Reproducción*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, Pp 149-174.

- Celestinos C. 2003. Evaluación de la sobrevivencia in vitro de embriones de coneja bipartidos antes y después de la vitrificación. *Tesis de Magíster*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Christiansen IJ^a. 1989. Anatomía y Fisiología. En: Christiansen I. *Reproducción en el perro y en el gato*. Inter-Vet, Buenos Aires, Argentina, Pp 3-41.
- Christiansen IJ^b. 1989. Preñez. En: Christiansen I. *Reproducción en el perro y en el gato*. Inter.-Vet, Buenos Aires, Argentina, Pp 171-190.
- Corti LM. 2003. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado del perro (*Canis familiaris*). *Memoria de Titulación*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Crosby T, M Boland, A IL-Kamali, Gordon. 1980. Superovulation in the ewe using HAP. *Theriogenology* 13 (1), 92.
- Farrant J. 1969. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing?. *Nature* 222, 1175-1176.
- Feldman E, R Nelson. 2000. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. Ed. Inter.-Médica, S.A.I.C.I., Buenos Aires, Argentina.
- Gatica R. 1985. Hormonoterapia reproductiva. *VII Jornadas Latinoamericanas de Buiatría*. Pp 43.
- Gobello C. 2001. Inducción del ciclo estral en la perra. En: *Medicina y Biotecnología Reproductiva de caninos y felinos*. Facultad de Agricultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.
- Godoy, R. 1998. Descripción clínica, citológica y ecográfica del celo inducido con extracto hipofisiario equino (HAP) en la perra. *Tesis Médico Veterinario*, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

- Gordon I. 1982. Synchronisation of estrus and superovulation in cattle. In: *mammalian egg transfer*. Ed. C.E. Adams. C.R.C. Press. Boca Raton. Florida.
- Gordon I. 1994. Store and cryopreservation of oocytes and embryos. En: *Laboratory Production of Cattle Embryos*, Gordon I (ed), editores CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, Pp 293-328.
- Hafez ESE^a. 2000. Anatomía del Aparato Reproductor Femenino. En: *Hafez ESE. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. McGraw Hill Interamericana, México, Pp 20-52.
- Hafez ESE^b. 2000. Ciclos Reproductivos. En: Hafez ESE. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales..* McGraw Hill Interamericana, México, Pp 89-107.
- Hatoya S, Y Sugiyama, R Torii, V Wijewardana, D Kumagai, K Sugiura, K Kida, N Kawate, H Tamada, T Sawada, T Inaba. 2006. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. *Theriogenology* 66, 1083-1090.
- Intervet. 1999. Reproducción Canina. En: *Compendium de Reproducción Animal*. 3^a ed. Broers P (ed). Laboratorios Intervet S.A. España, Pp 125-157.
- Kaidi S, S Bernard, P Lambert, A Massip, F Dessy, I Donnay. 2001. Effect of conventional controlled rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol Reprod* 65, 1127-1134.
- Leibo S.P. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos *Theriogenology* 31, 86-95.
- Linder G, R Wrigth. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20, 407-416.
- Massip A, J Mulnard. 1980. Time-lapse cinematographic analyses of Hatching of normal and frozen-thawed cow embryos. *J Repr Fertil*. 58, 475-478.

- Monniaux D, D Chupin, J Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19,55-81.
- Moor R, L Cahill, F Stewart. 1980. Ovarian stimulation or egg production as a limiting factor of egg transfer. En: *IX International Congress on Animal Reproduction and A.I.* Madrid – España.
- Moor R, T Kruip, D Green. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation?. *Theriogenology* 21, 103-115.
- Moore N, J Shelton. 1964. Response of the ewe to a Horse Anterior Pituitary Extract. *Nature* 194, 1283-1284.
- Moore N. 1975. The control of time of Oestrus and ovulation and induction of superovulation in cattle. *Aust J agric Res* 26, 295-304.
- Murphy B, J Lussier, R Pierson, R Mapletoft. 1987. Superovulation in the cow. En: *IX Congress on Animal Reproduction*. Venado Tuerto.
- Palasz A, M Del Campo. 1995. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. En: *Seminario Internacional de Transferencia de Embriones, Biotecnologías y Técnicas Avanzadas*. Montevideo, Uruguay. Pp 78-85.
- Palma, G. 2001. Evaluación morfológica de los embriones bovinos. En: *Biotecnología de la Reproducción*, Palma (ed). Ediciones INTA. Balcarce, Argentina. Pp 125-174.
- Pineda M, CH Del Campo, 1970. Pubertad y Ciclo Sexual. En: Pineda M, del Campo CH. *Fisiología de la Reproducción de los Animales Domésticos*. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Pineda MH. 1991. Patrones reproductivos en perros. En: McDonald E, Pineda MH. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Interamericana McGraw- Hill, México, Pp 448-473.

- Reynaud K, A Fontbonne, N Marseloo, C Viaris de Leseqno, M Saint-Dizier, S Chastant-Maillard. 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology* 66, 1685-1693.
- Reynaud K, A Fontbonne, N Marseloo, S Thoumire, M Chebrou, C Viaris de Leseqno, S Chastant-Maillard. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *J Reprod Fertil* 130, 193 – 201.
- Rodrigues B, j Rodrigues. 2006. Responses of canine to in vitro maturation and in vitro fertilization outcome. *Theriogenology* 66, 1667-1672.
- Saint-Dizier M, Renard JP y S Chastant-Maillard. .2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 121, 97–105.
- Salas F. 1984. Inducción de Superovulación en Cabras. Tesis, *Médico Veterinario*. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- Sciarresi I, J Correa, R Gatica. 1984. Inducción de Ovulación en terneras. *Arch. Méd. Vet.* 16(2), 99-101.
- Schiewe M, P Schmidt, D Wildt. 1986. Toxicity potential of ethylene oxide in straw containers used for embryos cryopreservation. *Theriogenology* 25, 194 (abstract).
- Seidel G, S Seidel. 1982. The embryo transfer industry. In: *New Technologies in Animal Breeding*. Eds. B.G. Brackett, G. E. Seidel, Jr. and S.M. Seidel. Academic Press, New York.
- Short R, Hay F. (1964). Delayed implantation in roe deer. *Reprod Fertil* 9, 373.
- Songsasen N, B Buckrell, C Plante, S Leibo. 1995. In Vitro and in vivo survival of cryopreserved Sheep Embryos. *Cryobiology* 32, 78-91.
- Sreenan J.M, M.G Diskin.1986. Embryonic mortality in farm animals. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* 34, 34 -280.

- Stornelli M, F Gimenez, C Tittarelli, C Savignone, R de la Sota, 2006. Inducción de ciclos estrales en la perra: Actualizacion bibliográfica. *Analecta Veterinaria* 25 (2), 39-54.
- Thibier M. 2000. The IATES statistic of the embryos transfer in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vitro-derived embryos transferred A data retrieval committee report Embryos transfer. *New-letter*, 24-28.
- Tsutsui T y Shimizu T. 1975. Studies on the reproduction in the dog. *Jpn J Anim Reprod* 21, 65-69.
- Tsutsui T, T Hori, H Okazaki, A Tanaka, M Shiono, M Yokosuka, E Kawakami. 2000. Transfer of Canine Embryos at Various Developmental Stages Recovered by Hysterectomy or Surgical Uterine Flushing. *J Vet Med Sci* 63, 401-405.
- Tsutsui T, T Shimizu, T Hori, E Kawakami. 2002. Factors Affecting Transuterine Migration of Canine Embryos. *J vet med sci* 64 (12), 1117-1121.
- Versteeger J, K Onclin, L. Silva, P Concannon. 1997. Termination of Obligate Anoestrus and Induction of Fertile ovarian Cycle in Dogs by Administration of Purified pig LH. *J. Reprod. And Fer.* 111, 35-40.
- Wallace S, M Mahaffey, D Miller, P Thompson, P Chakraborty. 1992. Ultrasonographic Appearance of the Ovaries of Dogs during the Follicular and Luteal Phases of the Estrus Cycle. *Am J Vet Res* 53, 209-215.
- Wildt D, W Panko, P Chakraborty, S Seager. 1979. Relationship of serum estrone, estradiol- 17β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod* 20, 648-658.

8. ANEXOS

ANEXO 1.

Preparación del Extracto Hipofisiario Equino (HAP), descrito por Moore y Shelton (1964).

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 sílica 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.

La efectividad del extracto fue probada, previo a ser utilizado en las perras, en ratones Rockefeller. Para esto se utilizaron seis hembras prepúberes de entre 20 y 23 días de edad, las cuales fueron divididas en 3 grupos (de 2 hembras cada uno). El primer grupo se utilizó como control, al segundo grupo se le inyectó 6mg de HAP, intraperitoneal (IP), en 2 dosis de 3mg, y finalmente al tercer grupo se le inyectó una dosis única de 7,5mg de HAP, intraperitoneal (IP)

45 horas después de la primera inyección de HAP, además se les inyectó a las hembras 5 UI de HCG vía IP, y se juntaron con un macho adulto, mayor a 80 días. A las 48 horas después las hembras fueron sacrificadas para extraer útero y ovarios lo cuales fueron pesados, para observar el incremento en el peso del tracto reproductivo.

ANEXO 2.**MEDIO DULBECCO (Para un litro)**

COMPONENTES	CANTIDADES
NaCl	8,00 gramos
KCl	0,20 gramos
KH ₂ PO ₄	4 1,15 gramos
MgCL ₂ 6H ₂ O	0,10 gramos
CaCL ₂	0,10gramos
Na piruvato	0,036gramos
Glucosa	1,00gramos
BSA	3,4 gramos
Penicilina	0,100gramos
Estreptomicina	0,100gramos

Nota: se puede suplementar con BSA o Suero fetal o Suero bovino al 1 o 3%.

Medir Ph: 7,3 a 7,4

Filtrar el medio y guardar a 4 °C.

ANEXO 3.

Stock de TCM 199 (Para 50 ml)

Componentes	Laboratorio	Cantidades
TCM 199 polvo	Sigma	0,75gramos
NaHCO ₃	Sigma	0,11 gramos
Agua ultrapura	Desionizador/ Sigma	hasta 50ml

Ajustar Ph: 7,3 - 7,4

Filtrar y guardar a 4 °C por un mes máximo.

Solución de TCM199 más 1 M de Sacarosa

Componentes	Cantidades
TCM199 stok	10 ml
Sacarosa	3,42 gr

ANEXO 4.

Tincio doble de fluorescencia:

- TCM 199 (25 mM Hepes) más 10 µg/ml de Propidio Iodado (Sigma).
- Etanol 70%.
- Etanol más 10 µg/ml de Bisbenzamida (Hoechst 33342).
- Glicerol

Los embriones fueron incubados por 15 minutos en 39°C en medio TCM199 (suplementado con Hepes) con 10 µg/ml. de Propidio Iodado. Luego fueron fijados en Etanol helado al 70% por 5 minutos, y después transferidos a Etanol que contenía 10 µg/ml. de Bisbenzamida por 5 minutos a temperatura ambiente. Los embriones fueron transferidos a una gota del glicerol en porta objetos, cubierta con un cubre objetos, y examinados por microscopia de fluorescencia (Kaidi 2001).

ANEXO 5.

Medio de Cultivo *in vitro* de embriones (para 30 ml):

Componentes	Catidades
- Piruvato de Sodio (0,33 mM)	1,08 mg.
- Glucosa	5,4 mg.
- Taurina	18,75 mg.
- Lactato de Sodio (60%)	14,1 ml.
- BME (12 aminoácidos esenciales)	600 μ l.
- MEM (7 aminoácidos no esenciales)	300 μ l.
- Gentamicina	30 μ l.
- Suero Fetal Bovino (10%)	3 ml.
- BSA FF (Albúmina Sérica Bovina, Fatty Free)	180 mg.
- Glicina	11,25 mg.
- TCM 199 (25 mM Hepes)	Hasta 30 ml.

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Patrocinante, el Dr. Renato Gatica, no sólo por permitirme realizar esta Memoria de Título, sino, por enseñarme a pensar, y por su gran paciencia.

A mis padres, por ayudarme a solventar mis estudios, ya que sé que fue un gran esfuerzo para ellos.

A Elsa Mansilla por ser una gran compañera de trabajo y amiga. Y a todos mis amigos y amigas, por su comprensión cuando los deje solos por el trabajo y por estar en cada momento pendientes de mí.

Al Centro de Deportes de la Universidad Austral de Chile por otorgarme durante mi Carrera la Beca Deportiva y así poder solventar mis estudios. Especialmente a Mi Sensei de Judo el Sr. Alejandro Parra Montero por haber confiado y enseñarme a ser una mejor persona.

A la Sra. Carmen y al Dr. Correa por su confianza, paciencia, y por sus valiosos consejos.

Al Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, por haber creído en mí.

A don Rubén, don Sergio y a Carola por su apoyo fundamental en este periodo.

Y a todas aquellas personas que no nombro, pero que me ayudaron y apoyaron en los momentos difíciles.