



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Veterinarias

Instituto de Reproducción Animal

**Efecto del tratamiento repetido con FSH + eCG en la respuesta Ovárica
y aspiración folicular vía Laparoscopica en terneras Prepuberes**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.**

Iván Gonzalo Herrera Rebolledo

Valdivia Chile 2000

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Jorge Correa Soto.
Nombre


Firma

PROFESOR COLABORADOR

Dr. Mauricio Silva Jimenez.
Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Rafael Burgos Aguilera.
Nombre


Firma

Dr. Ricardo Castillo Delgado.
Nombre


Firma

FECHA DE APROBACION: 04-11-2000

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	11
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSION	30
7. BIBLIOGRAFIA	34
8. ANEXOS	38

1. RESUMEN

El uso de terneras prepúberes como donantes de embriones podría acortar el ciclo productivo de la hembra y lapso intergeneracional. Por esta razón adquiere importancia la aspiración folicular como técnica para la obtención de ovocitos.

El propósito de esta tesis fue implementar la técnica de aspiración folicular por medio de laparoscopia en terneras prepúberes y validar la hipótesis que un tratamiento previo de FSH + eCG produce un mayor crecimiento folicular cuando terneras de 60 días de edad son tratadas con gonadotrofinas.

Doce terneras prepúberes Frisón Negro, fueron asignadas a dos grupos de seis animales. En el Grupo 1 las terneras fueron tratadas con una inyección única de FSH (140 mg) más eCG (200 UI) a los 36 días de edad y sometidas a una intervención laparoscópica con el fin de cuantificar los folículos y aspirarlos para obtener ovocitos madurados *in vivo* con LH (4,5 mg) 18 hrs previas a la laparoscopia. El tratamiento gonadotrófico se repitió a los 56 días, y la laparoscopia a los 60 días de edad.

Al grupo 2 se le inyectó suero fisiológico a los 36 días de edad, y tratamiento gonadotrófico a los 56 días. Con sus correspondientes laparoscopías a los 40 y 60 días de edad.

En el Grupo 1 se observaron $9,8 \pm 5,2$ y $10,5 \pm 2,3$ folículos mayores de 3 mm a los 40 y 60 días de edad respectivamente. Y para el Grupo 2 se observaron $2,8 \pm 3,6$ y $8,5 \pm 5,3$ folículos mayores de 3 mm a los 40 y 60 días de edad. Sólo hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el grupo 1 y 2 a los 40 días de edad.

Con relación a la eficiencia de aspiración se obtuvo un 81.6 % de ovocitos del total de folículos cuantificados.

Se obtuvo un 63 % de complejos cúmulos ovocitos (COC) totalmente rodeados por células del cúmulo, y un 57 % de los COC presentaban cúmulos expandidos.

De este trabajo se pudo concluir que: el método de aspiración folicular a través de laparoscopia en terneras prepúberes permite recuperar COC en un alto porcentaje (81,6 %), el método puede repetirse con 20 días de diferencia sin señales aparentes de secuelas, y que no existe un efecto positivo a tratamientos gonadotróficos previos (mayor número de folículos) en la respuesta ovárica de terneras prepúberes.

Palabras claves: terneras, prepuber, gonadotrofinas, laparoscopia, aspiración folicular, ovocito.

2. SUMMARY

The use of prepubertal calves as embryo donors can reduce the production cycle and the generation interval in cattle. Therefore, the application of follicular aspiration as a technique for oocyte collection could be of outmost importance.

The aims of this work were to set up the laparoscopy technique to achieve follicular aspiration and to study the effect of a previous gonadotrophic stimulation on the ovarian response (measure as number of follicles larger than 3 mm in diameter).

Twelve prepubertal Black Frisian calves were randomly assigned to two groups of six animals. Calves in Group 1 were treated with a single injection of FSH (140 mg) plus eCG (200 IU) at 36 days of age; calves in Group 2 were injected with saline. A laparoscopy was carried out on day 40, 18 h after a LH (4.5 mg) injection, in order to measure ovarian response and to puncture them for oocytes aspiration.

Animals of both groups were treated with a similar gonadotrophic treatment (FSH plus eCG) on day 56; LH (4.5 mg), and the corresponding laparoscopies were performed at day 60 of age for ovarian study and follicular aspiration. Cumulus oocytes complex (COC) were classified as: A (oocyte completely rounded by cumulus cells), B (oocyte partially rounded by cumulus cells) and C (naked oocyte).

Animals in Group 1 showed 9.8 ± 5.2 and 10.5 ± 2.3 follicles larger than 3 mm when 40 and 60 days old, respectively. On the other hand, Group 2 showed 2.8 ± 3.6 and 8.5 ± 5.3 follicles larger than 3 mm when 40 and 60 days old, respectively. Significant differences ($P < 0.05$) were observed between Group 1 and 2 on day 40.

A 81.6 % aspiration efficiency of oocytes was obtained with respect to the total of follicles quantified. In relation to the COC quality 63 % were A, 22 % B and 15 % C, respectively. Independently of A or B category 57 % of COC exhibited expanded cumulus.

The results of this study proved that follicular aspiration through laparoscopy technique in prepubertal calves allowed a high recovery rate of COC and secondly, the method can be repeated at 20-days intervals with no apparent symptoms of side-effects. Finally no positive effect of a previous gonadotrophic treatment (greater number of follicles) in the ovarian response was observed when prepubertal calves are treated with a single FSH and eCG for multiple follicular growth stimulation.

Keywords: calves, prepubertal, gonadotrophins, laparoscopy, follicular aspiration, oocyte.

3. INTRODUCCION

Las biotecnologías reproductivas aplicadas a los animales domésticos deben su desarrollo a tres intereses. El primero de carácter económico, en el sentido de la búsqueda de aumentar los niveles de eficiencia y productividad de la industria ganadera, dada por el aumento sostenido de la población mundial y su demanda por productos de origen animal. La segunda es de un interés médico por solucionar problemas reproductivos y de salud en el hombre; Y por último, el interés por salvaguardar animales en amenaza o peligro de extinción.

La biotecnología de mayor impacto ha sido, hasta el momento, el desarrollo de la inseminación artificial, técnica ampliamente difundida en el mundo. Con esta se ha podido realizar mejoramiento genético en las especies domésticas, principalmente en bovinos.

La segunda en importancia, es el desarrollo de la transferencia de embriones, técnica que también es difundida en el mundo, pero no ampliamente en nuestro país.

El desarrollo de la transferencia de embriones permite aumentar el número de crías que deja una hembra. Por lo cual, se han alcanzado importantes avances durante los últimos años especialmente en lo relacionado con un mejoramiento en las técnicas de recolección y transferencia de embriones en el bovino (Silva, 1988).

En la transferencia de embriones debe usarse como donantes vacas de alta calidad, por lo tanto es importante conocer las características genéticas de estas hembras, incluso lo ideal sería hacer una prueba de progenie similar a la que se realiza en toros usados en centros de inseminación artificial. Lamentablemente su implementación está limitada por el largo del ciclo reproductivo de la hembra bovina, además del escaso número de crías que ella tiene y el tiempo que habría que esperar para conocer las características productivas de sus descendientes (Silva, 1988). Sin embargo, la hembra bovina tiene un potencial alto de descendientes, ya que las terneras al momento de nacer poseen una importante cantidad de ovocitos en sus ovarios, alrededor de 133.000 (Erickson, 1966).

Hoy en día por medio del desarrollo de la fecundación *in vitro* se pueden obtener embriones provenientes de este material de reserva, ya que se han desarrollado técnicas que permiten una adecuada obtención de gametos tanto en cantidad como en calidad, masculinos y femeninos. Por esta razón la aspiración folicular es un método que permitiría la obtención de ovocitos, para que por medio de la fecundación *in vitro*, se produzcan embriones.

3.1 Terneras como donadoras de ovocitos.

La incorporación de hembras prepúberes como donantes de embriones podría acortar el ciclo productivo de la hembra, y a la vez contribuiría a la ejecución de pruebas de progenie en vacas al acortar el lapso intergeneracional (Onuma y col, 1969).

Las tasas anuales de mejoramiento genético son determinadas por cuatro factores:

- 1.- Intensidad de selección (**L S.**).
- 2.- Exactitud de la selección (**E. S.**).
- 3.- Desviación genética estándar o variabilidad genética (D. G. E.).
- 4.- **Intervalo generacional** o período entre el nacimiento de un animal y el nacimiento de su descendencia (**I. G.**).

El mejoramiento genético depende de estos factores como se muestra en la siguiente fórmula (Rendel y Roberson, 1950).

Mejoramiento Genético Anual:
$$\frac{(\mathbf{L.S.}) \times (\mathbf{E.S.}) \times (\mathbf{D.G.E.})}{\mathbf{I.G.}}$$

El uso de ovocitos obtenidos de donantes fetales ha sido sugerido como una alternativa para reducir este intervalo generacional (Betteridge y col., 1989); sin embargo, beneficios significativos se han observado con la utilización de ovocitos provenientes de terneras prepúberes (George y Massey, 1991). La producción de embriones a través de la fecundación *in vitro* de ovocitos obtenidos de terneras prepúberes, permitiría obtener crías antes que ellas alcancen un año de vida (Armstrong y col, 1992).

El uso combinado de los programas de múltiple ovulación y transferencia de embriones, con la producción *in Vitro* de embriones utilizando ovocitos de terneras, aumentaría la ganancia genética en un 22 % por sobre los programas convencionales de test de progenie, en un periodo de 25 años (Lohuis, 1995).

Tervit y col. (1995) superovularon terneras de 3 meses de edad con tratamientos en base a eCG, FSH y GnRH. Dichas terneras fueron inseminadas mediante laparoscopia, y sus embriones fueron recuperados 7 días después de la inseminación artificial. Las terneras presentaron desarrollo folicular de 10,9 folículos en promedio, de los cuales una baja proporción óvulo (3,1). La tasa de recuperación de embriones descrita fue baja (0,6 %) y todas las *ova* recuperadas no estaban fecundadas.

El número de embriones producidos *in vitro* utilizando ovocitos de terneras, que han sido transferidos a hembras receptoras ha sido bajo, como también lo ha sido la tasa de sobrevivencia hasta el nacimiento de estos embriones.

Kajihara y col. (1991) reportaron el nacimiento de un ternero, producto de la transferencia de un blastocisto congelado-descongelado producido *in vitro*, después de la maduración de un ovocito proveniente de una ternera de 4 meses de edad, que recibió un tratamiento gonadotrófico. En este trabajo 3 blastocistos congelados-descongelados fueron transferidos individualmente, lográndose por lo tanto una tasa de preñez de un 33 % (1 / 3).

Armstrong y col. (1992) también describieron el nacimiento de un ternero vivo producto de la transferencia de un blastocisto fresco, producido por la fecundación y cultivo *in vitro* de un ovocito de ternera madurado *in vivo*. Estos autores utilizaron 3 receptoras a las cuales les fueron transferidos un blastocisto (2 provenientes de ovocitos madurados *in vitro* y 1 de un ovocito madurado *in vivo*) acompañado de 1 ó 2 mórulas provenientes de los mismos grupos de maduración ovocitaria. La tasa de nacimientos vivos lograda en este trabajo fue de un 13% (1/8).

Por su parte, Revel y col. (1995) señalaron que la transferencia de 14 blastocistos producidos con ovocitos de terneras no tratadas a 14 receptoras y de 18 blastocistos provenientes de ovocitos de terneras tratadas a 9 receptoras, resultó en una tasa de preñez inicial (21 días) de 36 y 66 % respectivamente, y tasas de preñez confirmada posterior a los 6 meses, de 0 y 11 % para cada uno de los grupos. Sólo una de las 9 receptoras (11 %) que recibieron embriones producidos con ovocitos de terneras tratadas, mantuvo la preñez a término y parió un ternero de 45 Kg. La tasa de gestación a término con respecto al número de embriones transferidos reportada por estos autores, fue de un 3 % (1 / 32) comparada con un 38% (107 / 26) obtenida con blastocistos producidos con ovocitos de vacas adultas. De acuerdo a estos autores, la viabilidad posterior de los blastocistos producidos con ovocitos de terneras es severamente desmejorada, pudiendo deberse a mayores mortalidades embrionarias o fetales, siendo estas últimas el doble que al transferir blastocistos derivados de ovocitos de vacas.

Rotaras y col. (1995) reportaron tasas de preñez a los 30 días de 43 % (5 / 12) al transferir embriones frescos y de 9 % (2 / 23) al transferir embriones congelados-descongelados. Otros reportes de tasas de preñez a término son los realizados por Tervit y col. (1995) (3 / 13, 23 %) y Lewis y col. (1995) (7 / 21, 33 %).

Fry y col. (1998) obtuvieron tres preñeces detectadas por ultrasonografía al día 60 de gestación, producto de 19 embriones transferidos.

De lo expuesto anteriormente, puede decirse que la ternera prepuber ofrece algunas ventajas como animal experimental, por ejemplo su carencia de ciclicidad. Esta permite diseñar experimentos a conveniencia de los investigadores sin restricciones de sincronizaciones previas. La facilidad de manejo y su bajo costo económico de mantención son otras características que atraen el realizar experimentos en terneras. Como se ha señalado

anteriormente, la obtención de ovocitos desde terneras prepúberes también tendría la ventaja desde el punto de vista genético porque contribuiría a la ejecución de test de progenie y acortamiento del lapso intergeneracional (Sciarresi, 1984).

Las técnicas de obtención de ovocitos en terneras de corta edad son variadas, encontrándose en la literatura reportes que describen métodos como laparotomía, laparoscopia y aspiración ultrasonográfica; también se describe la obtención de ovocitos desde ovarios recuperados pos sacrificio de la donante.

3.2 Aspiración folicular por el método laparoscópico.

La técnica laparoscópica por ser menos invasiva que la laparotomía, posibilita la realización de experiencias en forma más seguida, con menor riesgo de infecciones y un pos operatorio más reducido y seguro. Silva (1988), utilizando la técnica de aspiración por medio de laparotomía, señala que tuvo dificultad en la exposición de ovarios de terneras prepúberes especialmente en aquellos de gran tamaño y por la presencia de cierto grado de adherencia entre bolsa ovárica y ovario.

Al igual que la laparotomía, la laparoscopia es un procedimiento invasivo que debe realizarse bajo anestesia general. Armstrong y col., (1991 y 1992) describen la realización de esta técnica sobre la línea media ventral, utilizando para efectuar la aspiración, ya sea una aguja de 1,5 mm de diámetro con lumen único o con doble lumen, la que posibilita generar un flujo de medio para lavar el folículo. La aguja a utilizar está conectada a una bomba de vacío regulado.

Las tasas de recuperación de ovocitos reportadas por Armstrong y col. (1992) utilizando esta técnica, fluctúan entre un 36,5 y 43,5 %. Estos mismos autores en el año 1991 obtuvieron tasas de recuperación de un 68 y 38 %, para 2 grupos de terneras que habían recibido un tratamiento gonadotrófico consistente en FSHp complementado con 1500 o 3000 UI de hCG respectivamente. La menor tasa de recuperación en el segundo grupo podría deberse, según los autores, a una mayor viscosidad de las células del cúmulo, producto de la mayor y más efectiva dosis de hCG, aplicada para producir maduración ovocitaria.

Armstrong y col. (1993) realizaron aspiración folicular laparoscópica en terneras prepúberes con estimulación gonadotrófica externa cada 3 semanas. La cantidad de folículos observados fueron de $4,2 \pm 1,0$ para 3 semanas, $6,9 \pm 1,8$ para 6 semanas y $22,3 \pm 6,0$ para 9 semanas de edad, con un $62,6 \pm 6,4$ % de recuperación de ovocitos.

Otro método poco traumático y menos invasivo es la aspiración folicular por medio de ultrasonografía y punción del fórnix vaginal, pero autores como Brogliatti y col. (1995) reportan menores tasas de recuperación por la dificultad de fijar el ovario para la aspiración, ya que el reducido tamaño de las terneras impide la fijación manual transrectal.

3.3 Estimulación gonadotrófica en terneras.

Las hormonas utilizadas para inducir ovulación (liberación de un oocito o formación de un cuerpo lúteo) o superovulación (desarrollo y ovulación de un número de folículos mayor que lo normal según Avery y col., 1962) son fundamentalmente las hormonas gonadotróficas. Estas hormonas pueden ser, por su efecto, sustancias que inducen maduración y ruptura del folículo (ovulatoria o luteinizante). Generalmente los tratamientos exógenos se basan en la asociación de ambos tipos de hormonas (Sciarresi, 1984).

Las hormonas que se utilizan para estimular el desarrollo folicular y la maduración de ovocitos de terneras, son FSH, eCG, GnRH, LH y hCG.

3.3.1 Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es una hormona glucoproteica secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis. La FSH estimula el crecimiento y maduración del folículo ovárico. Por si misma no causa la secreción de Estradiol a partir del ovario, pero en presencia de LH estimula la producción de estrógeno por ovarios y testículos (Hafez, 1996).

Dentro de los productos comerciales que contienen FSH-p (porcina), utilizada para la inducción de crecimiento folicular en terneras (también en hembras adultas), se encuentra el Folltropin®, administrado en dosis de 140 a 190 mg (unidades NIH.FSH-P1) y en regímenes de 1, 6, 8 o 9 inyecciones.

FSHp es la gonadotrofina más utilizada con este propósito; generalmente su administración consiste en regímenes de 6 - 8 inyecciones a intervalos de 12 horas, en dosis decrecientes o en dosis iguales.

Además, se han realizado intentos para lograr la superestimulación folicular administrando dosis únicas de FSHp subcutáneamente, como se realiza en ganado adulto, en comparación con regímenes de inyecciones múltiples. Sin embargo, estos últimos han resultado consistentemente en mayores respuestas foliculares y mejor calidad de ovocitos recuperados, en comparación con las administraciones únicas (Stubbings y col., 1993).

3.3.2 Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (eCG)

Es una glucoproteína con subunidades alfa y beta similares a las de LH y FSH pero con mayor contenido de carbohidratos, en especial ácido siálico. Al parecer este mayor contenido de ácido siálico es causa de la larga vida media (de varios días) de la eCG (Hafez, 1996).

La eCG tiene efectos biológicos tanto de FSH como de LH; los primeros son los dominantes. La eCG se aísla de sangre de yeguas preñadas y no se encuentra en la orina. Fue una de las primeras gonadotropinas disponibles en el comercio y se emplea para inducir la superovulación (Hafez, 1996).

La eCG a diferencia de la FSH requiere de una sola administración, esto dado que su vida media es más larga, siendo aproximadamente de unas 26 hrs. (Mc Donald, 1981).

La eCG ha sido utilizada en diversos trabajos en dosis totales entre 200 y 2000IU.

Esta hormona ha continuado utilizándose con el propósito de inducir crecimiento folicular en este tipo de terneras, administrándose sola (Monniaux y col., 1983; Bogliatti y col., 1995) o en conjunto con la hormona foliculo estimulante de origen porcino (FSHp) (Armstrong y col., 1993; Tervit y col., 1995).

3.3.3 Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Es una hormona hipotalámica constituida por diez aminoácidos, y como su nombre lo indica tiene efecto liberador de LH y FSH, pero más acentuado en el primero.

Swanson (1974) reportó que la administración de GnRH en terneras prepúbers provoca liberación de LH. Datos posteriores indican que la hipófisis de estas es capaz de secretar altos niveles de gonadotropinas en respuesta a estimulación con GnRH (Barnes y col., 1980)

Mellin y col. (1975) comprobaron que en terneras, que dos horas posterior a una dosis parenteral de GnRH se produce un pico de LH, el cual retorna a niveles basales 6 horas posterior a su aplicación.

Recientemente Fry y col. (1998) utilizaron dosis de 40 µg de GnRH para inducir maduración folicular (ovocito) *in vivo* de folículos (ovocitos) en terneras prepúberes.

3.3.4 Hormona Luteinizante (LH)

Es una hormona glucoproteica secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis. Las concentraciones tónicas o basales de LH actúan conjuntamente con las de FSH para inducir la secreción de estrógeno a partir del gran folículo ovárico. La oleada preovulatoria de hormona luteinizante causa la rotura de la pared folicular y la ovulación (Hafez, 1996).

Las oleadas de LH y FSH también inducen las fases finales de la maduración del ovocito precisamente antes de la ovulación (Hafez, 1996).

Con el acercamiento de la pubertad, la frecuencia de los picos de hormona luteinizante aumenta, seguida de un aumento transitorio en la oleada preovulatoria de la misma (Hafez, 1996).

Algunos grupos de investigadores se han concentrado en el desarrollo de regímenes hormonales tendientes a lograr una alta recuperación de ovocitos madurados *in vivo*, para lo cual complementan la superestimulación folicular con la administración, intramuscular o endovenosa, de LH (Duby y Robl, 1987), en dosis de 4,5 a 75 mg.

3.3.5 Gonadotropina Coriónica Humana (hCG)

Es una hormona glucoproteica sintetizada por las células sinciotrofoblásticas de la placenta de los primates. Esta se encuentra tanto en la sangre como en la orina (Hafez, 1996).

La subunidad alfa tiene 92 aminoácidos y dos cadenas de carbohidratos; es similar a la correspondiente de la LH de la mujer, cerda, oveja y vaca (Hafez, 1996).

Para lograr una alta recuperación de ovocitos madurados *in vivo*, se complementa la superestimulación folicular con la administración intramuscular o endovenosa de gonadotropina coriónica humana (hCG), en dosis de 1500 a 3000 UI al final del tratamiento (Armstrong y col. 1991, 1992; Looney y col. 1995), o de LH (Duby y Robl, 1987). La recuperación se efectúa entre las 22 a 40 hrs pos inyección de hCG o LH. Sin embargo, Armstrong y col (1992) lo recomiendan entre las 18 a 22 hrs, ya que reportaron ovulación posterior a estos tiempos.

3.3.6 Tratamientos gonadotróficos repetidos.

Irvine y col, (1993) realizaron estimulaciones gonadotróficas (con FSH y FSH+eCG) repetidas y aspiración folicular laparoscópica en terneras de 3 semanas, sugiriendo que no hay

diferencias significativas entre los grupos tratados con múltiples inyecciones de FSH y los tratados con FSH + eCG en una sola aplicación.

Presicce y col. (1997) aspiraron folículos de terneras a los 5, 7, 9 y 11 meses (un grupo con estimulación gonadotrófica y el otro sin estimulación). Los resultados fueron 18 ± 2 , 16 ± 2 , 13 ± 1 , y 15 ± 2 para el grupo estimulado, y 15 ± 2 , 12 ± 1 , 7 ± 1 , y 7 ± 1 para el sin estimulación.

Armstrong y col. (1992) trabajaron con terneras de 3 y 8 semanas de edad, con tratamientos repetidos. Sugirieron que la edad es el factor responsable de una respuesta folicular más alta en la segunda estimulación gonadotrófica, en comparación con la primera.

3.4 Objetivos.

1. Desarrollar la técnica de aspiración folicular por medio de laparoscopia y obtener ovocitos de hembras bovinas prepúberes.
2. A su vez evaluar el efecto de un tratamiento previo de FSH + eCG sobre la respuesta ovárica y recuperación de ovocitos mediante aspiración folicular laparoscópica en terneras prepúberes tratadas con gonadotrofinas exógenas.

3.5 Hipótesis.

Un tratamiento previo de FSH + eCG produce un mayor crecimiento folicular cuando terneras de 60 días de edad son tratadas con gonadotrofinas.

4. MATERIAL Y METODOS

Doce terneras Frisón Negro, menores de dos meses de edad y pertenecientes al fundo "Vista Alegre" de la Universidad Austral de Chile ubicado en Valdivia, fueron asignadas a los siguientes grupos.

GRUPO 1 (n = 6): Tratamiento gonadotrófico y aspiración folicular a los 40 y 60 días.

GRUPO 2 (n = 6): Tratamiento con solución salina y aspiración folicular a los 40 días.
Tratamiento gonadotrófico y aspiración folicular a los 60 días.

4.1 Tratamiento Gonadotrófico

El tratamiento gonadotrófico consistió en la administración única de 140 mg (NIH-FSH-P1 units) de hormona foliculo estimulante porcina (FSH-p) (Folltropin-V®, Vetrepharm, Canadá, lote: 30514-651) en conjunto con 200 IU de gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Folligon, Intervet, Holanda, lote: 28555), vía intramuscular. Sesenta horas después de la inyección de gonadotrofinas se aplicó 4,5 mg (NIH-LH-S19 units) de hormona luteotrófica porcina (LH-p) (Lutropin®, Vetrepharm, Canadá, lote: 57) por vía endovenosa. Dieciocho horas post LH se procedió a la aspiración folicular, como se presenta en el esquema de la Figura 1.

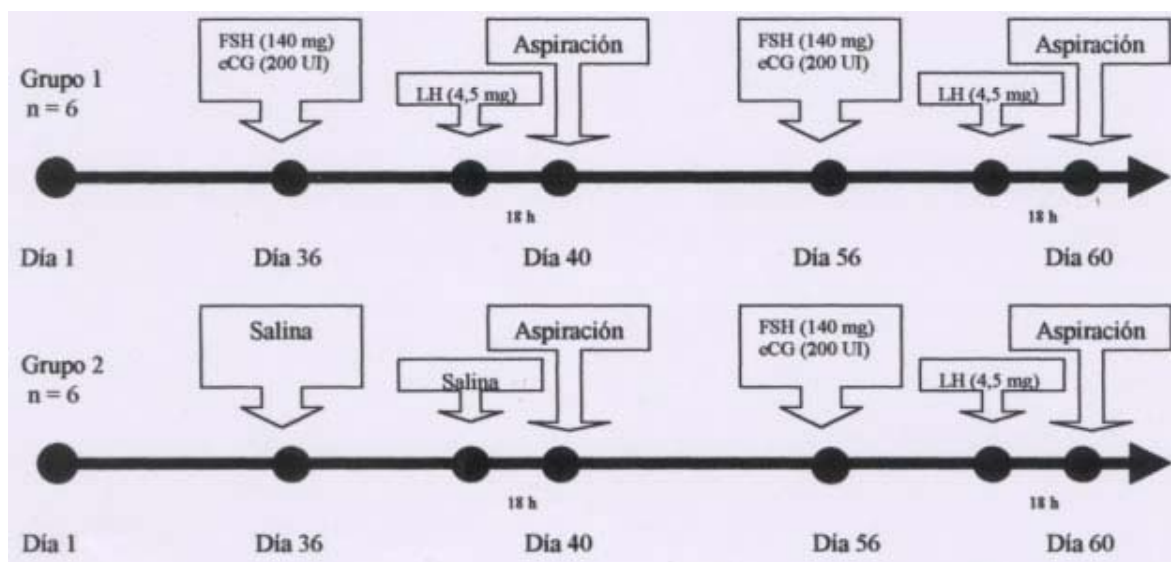


Figura 1: Esquema del tratamiento gonadotrófico en los grupos uno y dos de terneras.

4.2 Laparoscopia

Los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 hrs, luego fueron premedicados con atropina (Atroveran, Lab. Chile) en dosis de 0,044mg por kilogramo de peso vía intramuscular, y anestesiados con hidrocloreuro de 2-(2,6- xilidino)- 5,6- dihidro - 4H - 1,3 - tiacino, (Rompún 2%, Lab. Bayer) vía intramuscular, en dosis de 23,32mg por 100 kgs. Los animales se ubicaron en una camilla de sujeción (Davis y Correa, 1984) (Fig.2) en la cual ingresaron al pabellón de cirugía. Fueron depilados, lavados y desinfectados en la región medio-ventral con alcohol al 70 % y solución yodada.



Figura 2: ternera colocada en camilla (a), abdomen depilado (b).

La ternera fue cubierta totalmente con un paño de campo estéril y la intervención se realizó en un pabellón previamente sometido a luz ultra violeta. Se contó con todas las comodidades básicas: equipo de luz quirúrgica, paños, delantales y materiales estériles.

La camilla de sujeción, estando la ternera en posición decúbito dorsal, fue regulada de tal forma que los animales quedaran en posición cabeza abajo formando un ángulo con el suelo de aproximadamente 45 ° a fin de desplazar las vísceras cranealmente.

A continuación, se indujo pneumoperitoneo por insuflación de aire comprimido a través de una aguja de Yerres (Fig.3) de 13 cm por 2 mm de diámetro (\emptyset), la cual en su interior tiene una aguja roma retráctil que sobresale a la del exterior encubriendo el bisel.

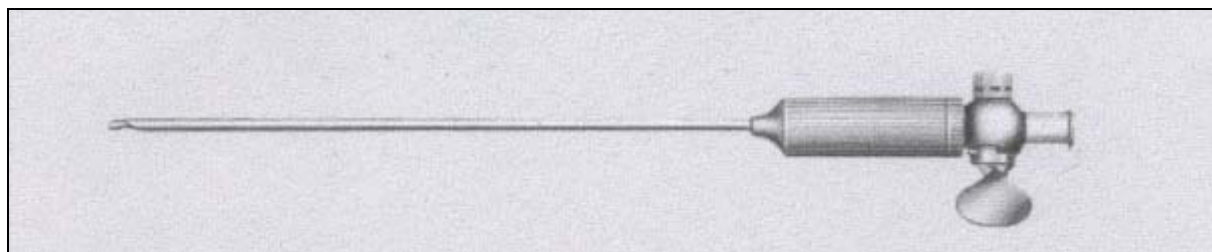


Figura 3: Aguja de Yerres.

Se realizó una pequeña incisión en la piel (1 a 1,5 cm) 6 a 10 cm caudal al ombligo y 3 a 4 cm lateral a la línea media. Después de la incisión de la piel, ésta fue desplazada hacia la línea media donde el trocar fue introducido a la cavidad abdominal.

A través de la incisión se introdujo un trocar de punta cónica (Fig.4 y 7) Storz 26020A de 11 mm Ø. Luego de perforar la pared abdominal, se retiró la parte central y en su lugar se introdujo una guía (Fig.5) Storz 2603 OC, la cual en su interior lleva el laparoscopio (Fig. 6 y 7) Storz, Hopkins, 26030B, 30°. A la guía (Fig. 5 y 7) se le conectó un proyector de luz fría a través de un cable de fibra óptica (Fig. 8).



Figura 4: Trocar para guía con laparoscopio

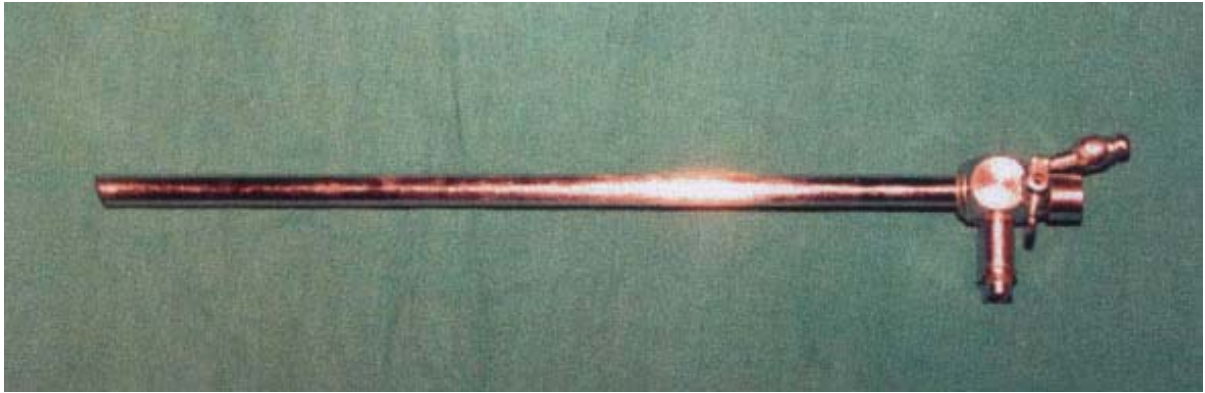


Figura 5: Guía de laparoscopia.

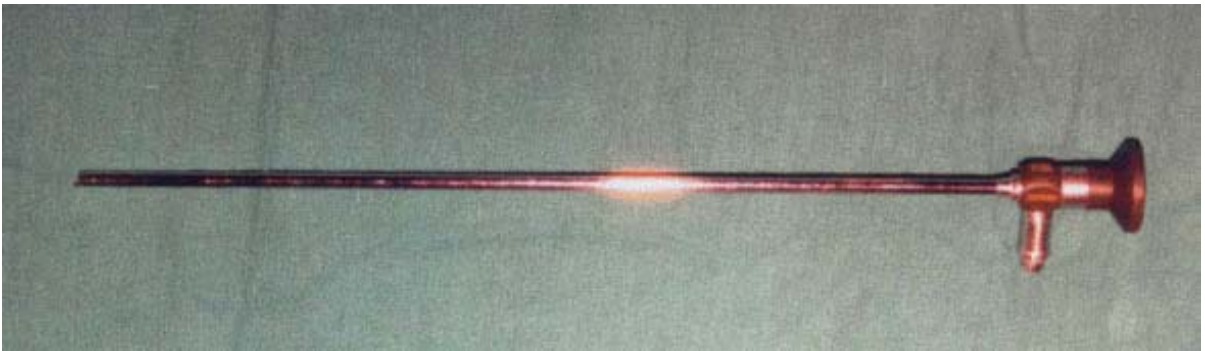


Figura 6: Laparoscopio.

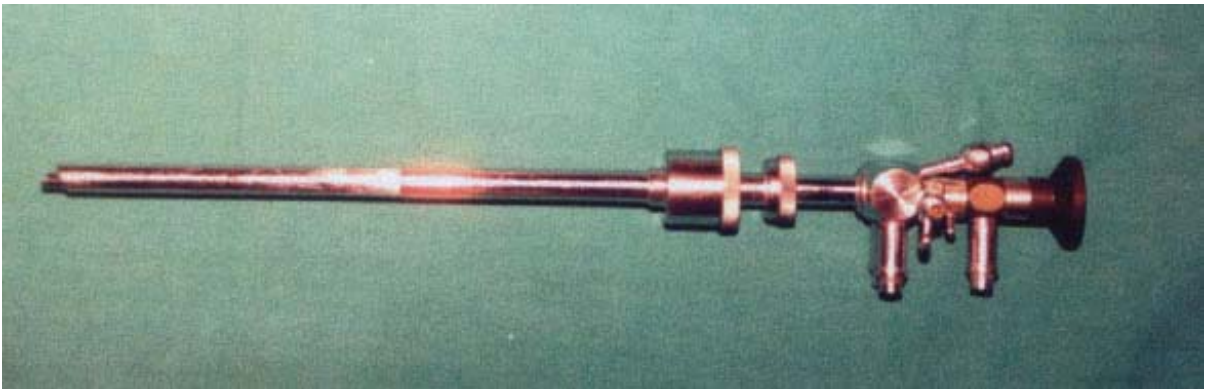


Figura 7: Trocar, guía y laparoscopio armados.

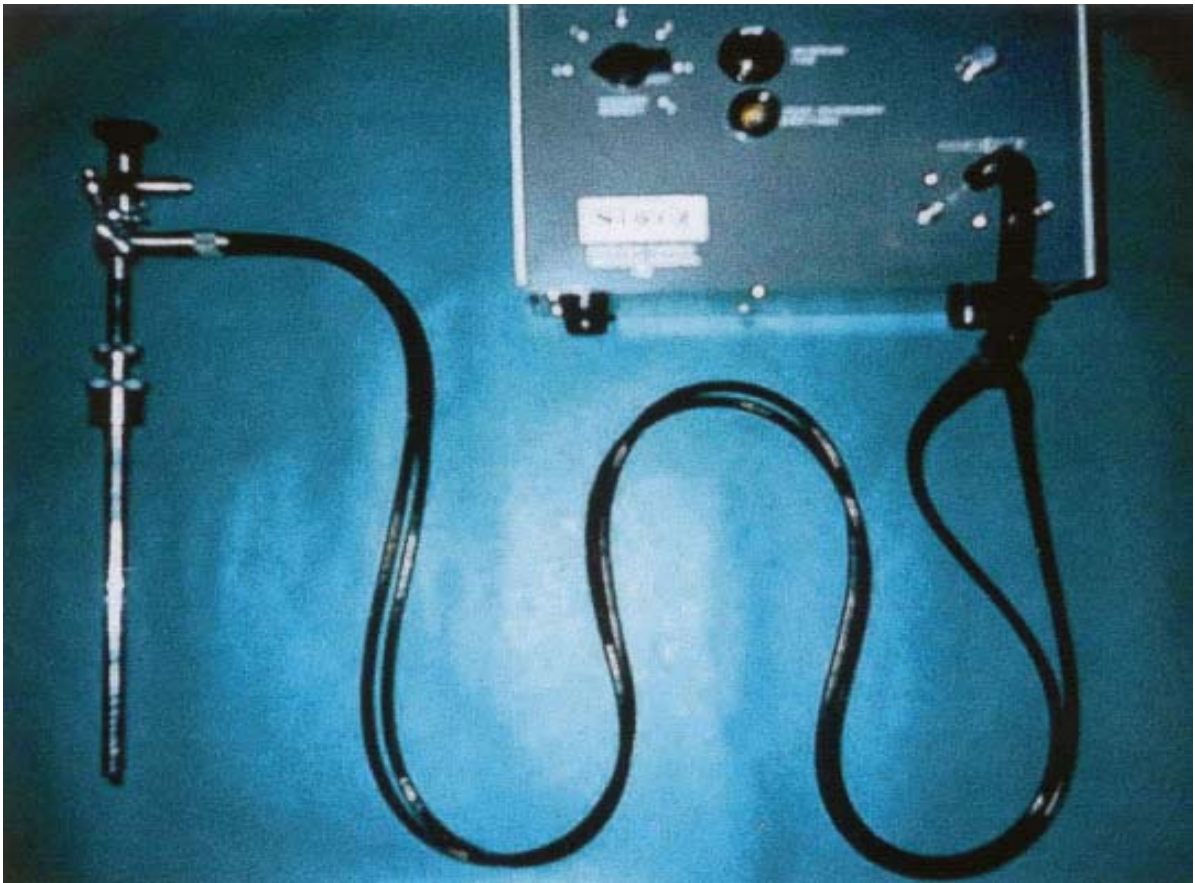


Figura 8: Laparoscopia completo unido a fuente de luz a través de un cable de fibra óptica.

Posteriormente se introdujo en la cavidad dos trocares, el primero (Fig. 10) Storz, 26172C, 5 mm ϕ , para el acceso de un fórceps atraumático (Fig. 9 y 10) para manipular y sujetar al ovario. El otro (Fig. 11), Storz, 2 mm ϕ , para una aguja de doble luz de 20 cm por 1,5 mm de ϕ (Fig. 11), Labotect, Göttingen, N° 9. Esta última, por la parte interna de su aguja interior, aspira el contenido folicular y líquido de lavado, ya que va conectada a un sistema cerrado de tubos que permitieron la aspiración, por la aplicación de vacío, del fluido folicular y el lavado de los folículos. Por el espacio formado entre la pared externa de la aguja interna y la pared interna de la aguja externa, se introduce el líquido de lavado, a través de un catéter, conectado a una jeringa de 10 ml con medio de lavado.

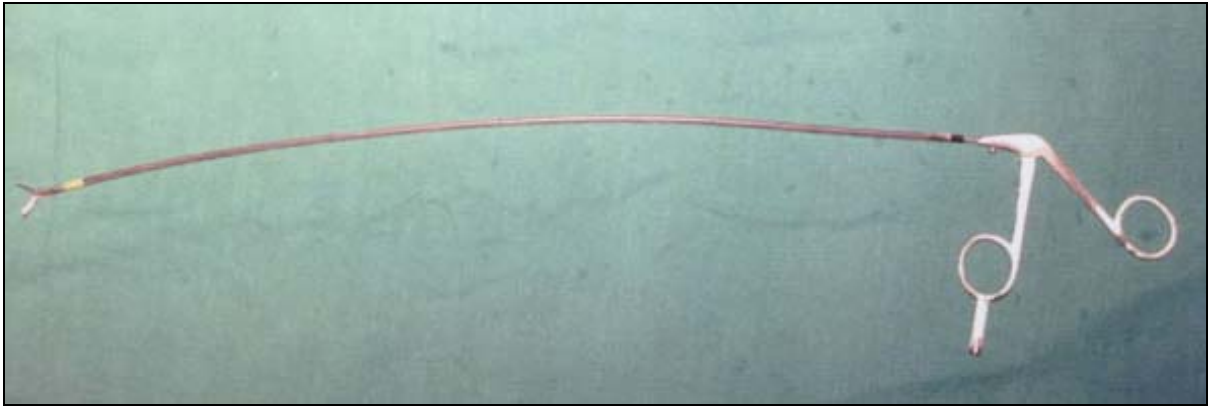


Figura 9: Fórceps.



Figura 10: Trocar con Fórceps.



Figura 11: Trocar y aguja de aspiración de dos vías.

Una vez reconocido el útero se procedió a tomar un cuerno, de esta forma moverlo y ubicar el ovario adyacente; luego de observarlo, se fijó del mesoovario para poder cuantificar sus folículos.

Se registró el número de folículos observados, número de folículos puncionados y el número de ovocitos obtenidos por animal. Los folículos observados fueron clasificados en dos grupos, de 3 mm a 7 mm de diámetro y mayores de 7 mm, tomando como referencia el bisel de la aguja que es de 3 mm.

Los resultados se sometieron a prueba de t de Student ($P < 0,05$) para identificar diferencias significativas.

El sistema de lavado estaba conformado por: jeringa con medio, aguja de aspiración, folículo, aguja de aspiración, tubo de recolección, trampa o botella de seguridad para evitar que el medio pudiese pasar a la bomba de vacío (Fig. 12). Todos los componentes estaban unidos por catéteres de 1,5 mm \varnothing (1,2 mm \varnothing interior) de diferentes longitudes (Fig. 13).

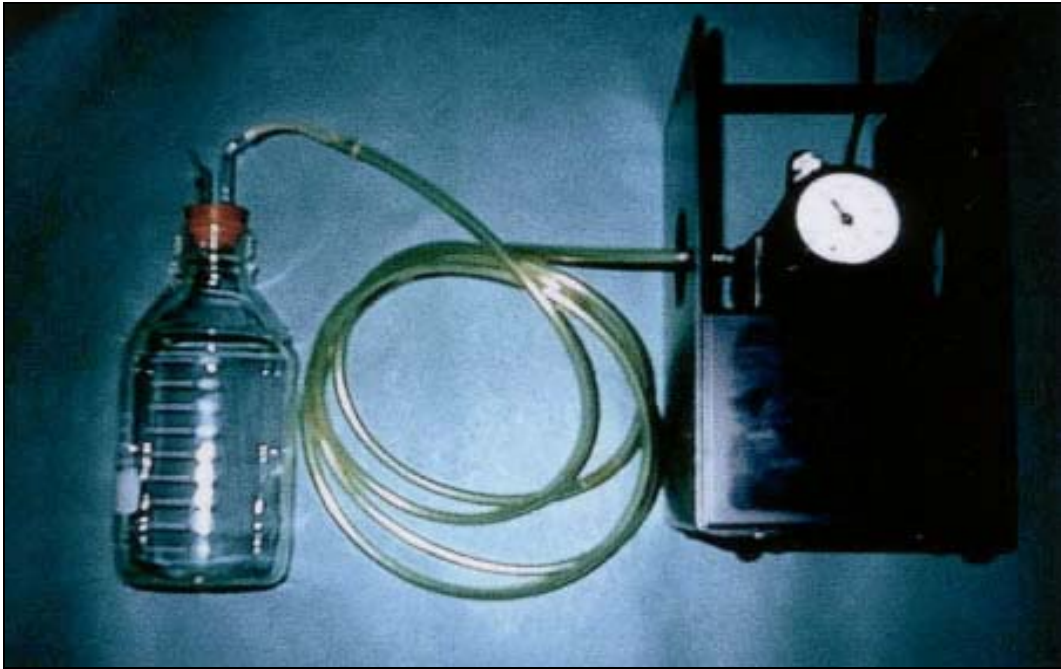


Figura 12: Trampa o botella de seguridad unida por medio de una sonda a la bomba de vacío.

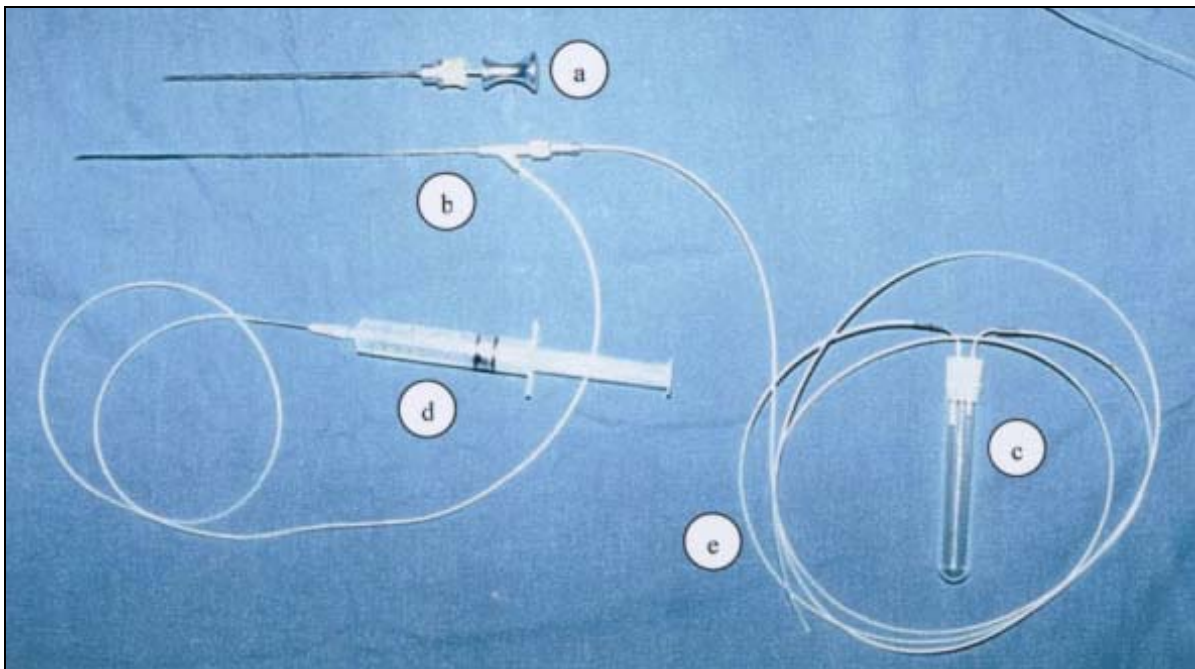


Figura 13: Trocar (a), aguja de dos vías (b), tubo de recolección (c), jeringa con PBS (d) y catéteres (e).

El contenido folicular fue aspirado mediante una bomba de vacío regulada que trabajaba a una presión de 150 mm de Hg . Al mismo tiempo, utilizando el vacío dentro del folículo, se introdujo medio de lavado para maximizar la recuperación de los ovocitos. El fluido folicular y medio de lavado fueron recolectados en tubos cónicos estériles (Iwaki, 13 ce) (Fig. 13 y 14) conteniendo 3 ml de medio de lavado. Dependiendo de la cantidad de sangre presente en el fluido folicular, fueron aspirados uno o varios folículos en un mismo tubo.

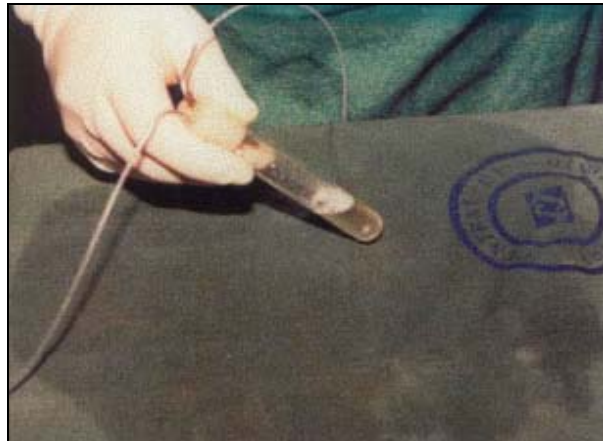


Figura 14: Tubo de recolección con líquido folicular



Figura 15: Materiales en matraz con líquido desinfectante (a) y materiales sobre paño de campo (b).

Los trocares se insertan en el abdomen como lo muestra las Figuras 16, 17 y 18.

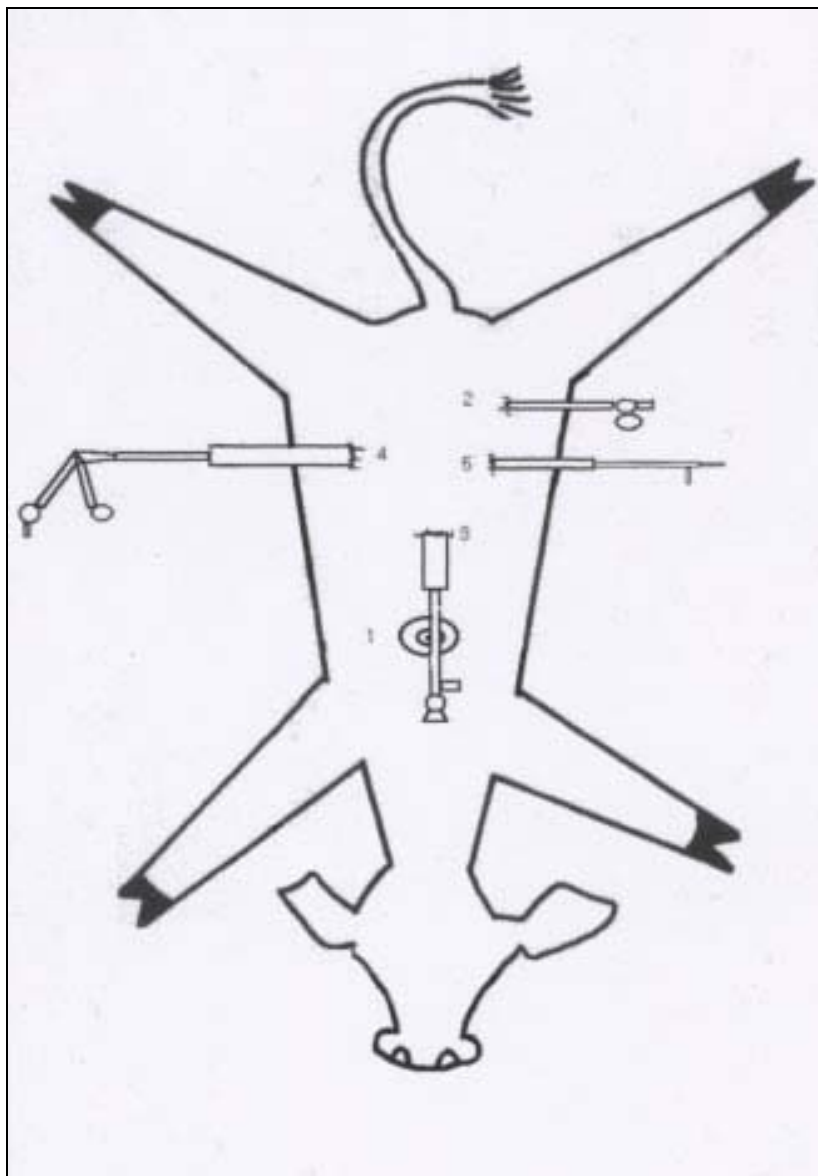


Figura 16: Esquematización de la ubicación de los instrumentos. (1) ombligo, (2) aguja de Yeres, (3) trocar y laparoscopio (6 -10 cm caudal al ombligo), (4) trocar y fórceps, (5) trocar y aguja de dos vías.



Figura 17: Vista general (a), vista parcial con los instrumentos insertos en el abdomen (b).

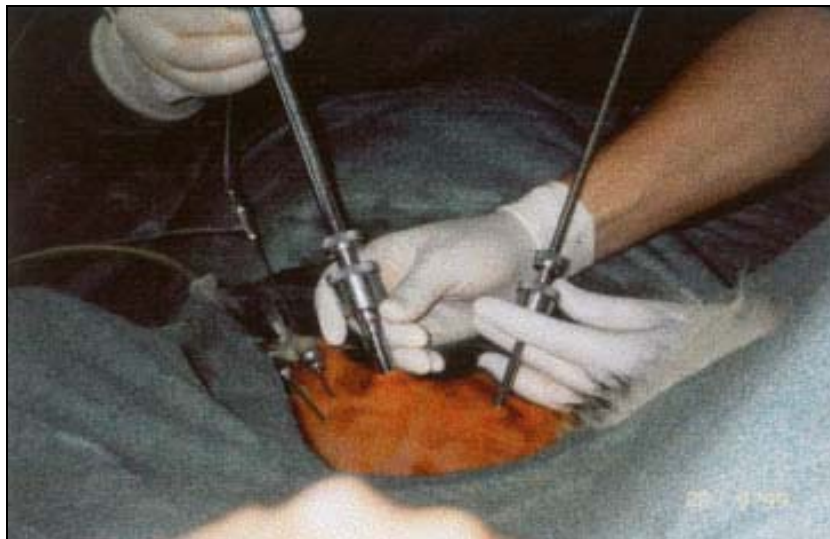


Figura 18: Instrumentos insertos en el abdomen de una ternera, vista caudo - craneal

Se usó como medio una solución de PBS (Solución Buffer Fosfato) para lavado folicular y recolección, complementado con suero fetal bovino (inactivado) a una concentración del 4 %, y 25 UI de heparina por ml de solución. El medio se mantuvo a baño María a una temperatura de 30°, previa utilización.

Los fluidos aspirados y de lavado fueron transferidos a placas Petri para ser examinados bajo lupa estereoscópica a 30 X, en busca de los complejos cúmulo-ovocito (COC).



Figura 19: Vistas generales sobre método de trabajo.

4.3 Evaluación de los COC

Los COC fueron observados bajo lupa estereoscópica a 30 X, para determinar la integridad y grado de expansión del cúmulo, fueron clasificados según las siguientes categorías (Fig. 20).

- Clase A: completamente rodeados por células del cúmulo.
- Clase B: parcialmente rodeados por células del cúmulo.
- Clase C: ovocitos desnudos.

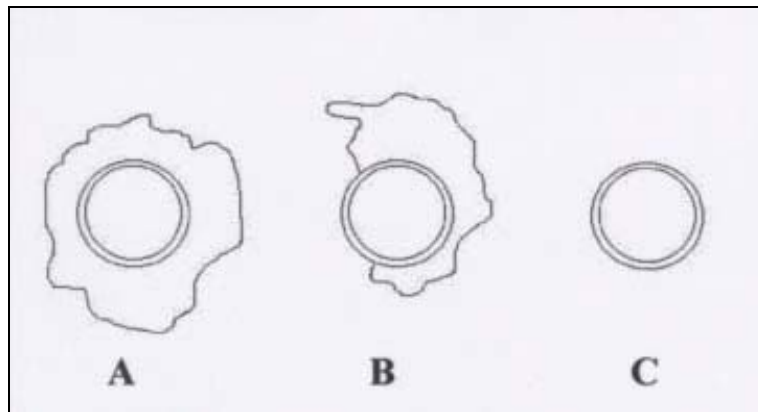


Figura 20: Esquema de los COC según la integridad de los cúmulos, A completamente rodeados por células, B parcialmente rodeados por células y C ovocito desnudo.

Los ovocitos que presentaban un cúmulo compacto fueron considerados inmaduros, mientras que aquellos que poseían un cúmulo expandido fueron considerados maduros.

5. RESULTADOS

No hubo grandes dificultades en la realización de las laparoscopías. Cabe señalar que en una ternera un folículo eclosionó espontáneamente cuando la pinza tocó el ovario, observándose la ruptura del folículo y como el líquido folicular escurrió hacia la bolsa ovárica.

Los resultados de las observaciones se muestran en los siguientes cuadros:

Cuadro 1: Respuesta ovárica en terneras prepúberes tratadas con FSH + eCGy LH a los 40 días de edad.

Grupo	n	Tratamiento	Fol. > 3-7 mm X ± de (rango)	Fol. > 7 mm X ± de (rango)	Fol. Totales X ± de (rango)
1	6	FSH + eCG y LH	3,2 ± 3,4 ^a (0-9)	6,7 ± 3,1 ^a (2-11)	9,8 ± 5,2 ^c (6,21)
2	6	Salina	1,5 ± 3,7 ^a (0,9)*	1,3 ± 0,8 ^b (1-3)	2,8 ± 3,6 ^d (1-10)

FSH (140 mg.), eCG (200 UI) y LH (4,5 mg.)

Las letras diferentes en sentido vertical indican diferencias significativas (P<0.05).

* Solo en una ternera se observó folículos de 3 mm a 7 mm.

Cuadro 2: Respuesta ovárica en terneras prepúberes tratadas con FSH + eCGy LH a los 60 días de edad, pretratadas con gonadotropinas a los 40 días (Grupo 1) o salina (Grupo 2).

Grupo	n	Tratamiento	Fol. > 3-7 mm X ± de (rango)	Fol. > 7 mm X ± de (rango)	Fol. Totales X ± de (rango)
1	6	FSH + eCG y LH	3,8 ± 4,8 ^a (0-11)	6,7 ± 5,5 ^b (0-14)	10,5 ± 2,3 ^c (7-14)
2	6	FSH + eCG y LH	3,7 ± 5,1 ^a (0-12)	4,8 ± 2,2 ^b (3-9)	8,5 ± 5,3 ^c (3-17)

FSH (140 mg.), eCG (200 UI) y LH (4,5 mg.)

Las letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

Con relación a la aspiración folicular laparoscópica en terneras prepúberes se obtuvo un 81,6 % de eficiencia (Cuadro 3). Además en ninguna de las intervenciones se apreciaron adherencias en los órganos internos y en la segunda intervención, en todas las terneras se apreció una pequeña cicatriz consolidada.

Cuadro 3: Total de folículos observados y porcentaje de ovocitos recuperados en ambos grupos.

Grupo	n	Folículos observados > de 3 mm	Ovocitos Recuperados	%
1	12	122	89	73
2	12	68	66	97,1
Total	24	190	155	81,6

Con relación al tamaño de los folículos aspirados se aprecian los siguientes resultados (Cuadro 4).

Cuadro 4: Folículos observados y porcentaje de ovocitos recuperados por tamaño de folículo aspirado.

Tamaño folicular	Folículos observados	Ovocitos recuperados	%
3 a 7 mm	73	66	90,4
> 7mm	117	89	76,1

Con respecto a los Complejos Cúmulos Ovocitos (COC), y en relación con la integridad del cúmulo y sus las características, estos tenían el siguiente aspecto (Fig. 21, 22, 23).

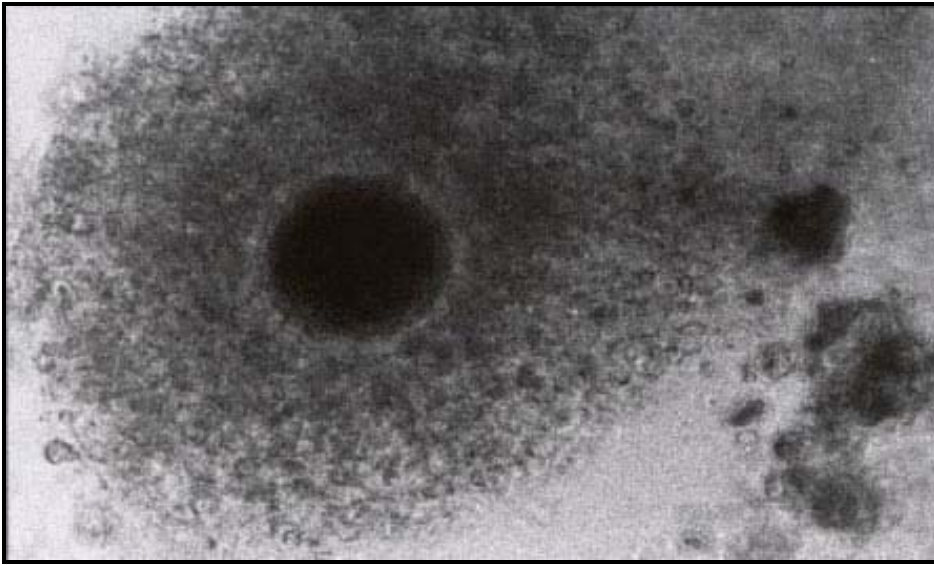


Figura 21: COC clase A, completamente rodeados por células del cúmulo.

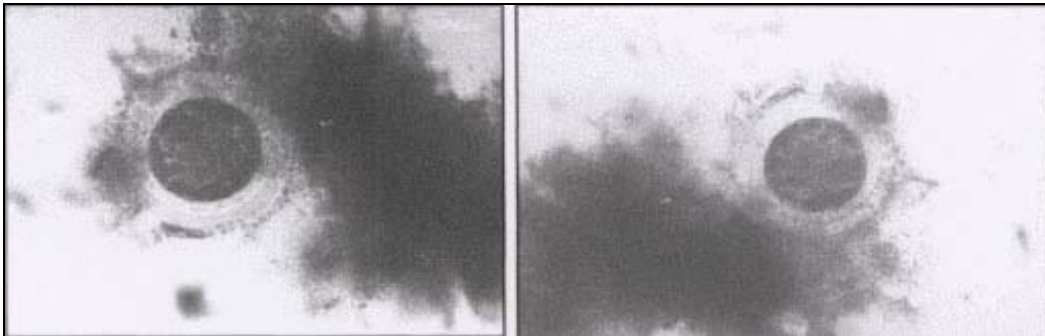


Figura 22: COC clase B, parcialmente rodeados por células del cúmulo.

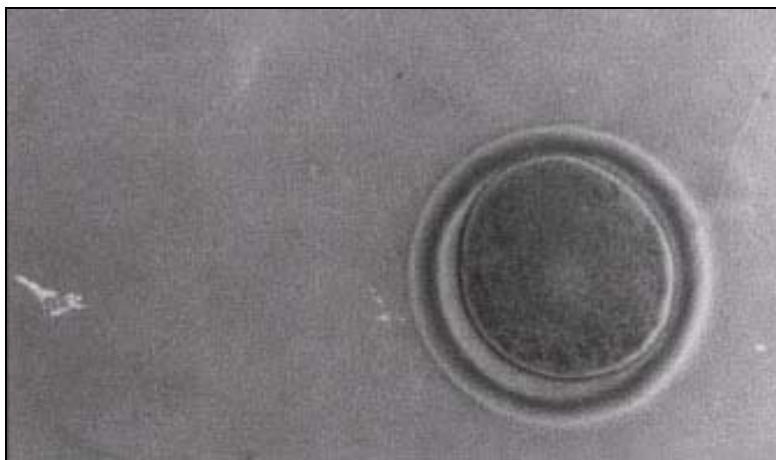


Figura 23: COC clase C, ovocito desnudo.

Los porcentajes de COC obtenidos según la integridad del cúmulo y tamaño de los folículos se exponen en los siguientes gráficos (Gráfico 1, 2 y 3).

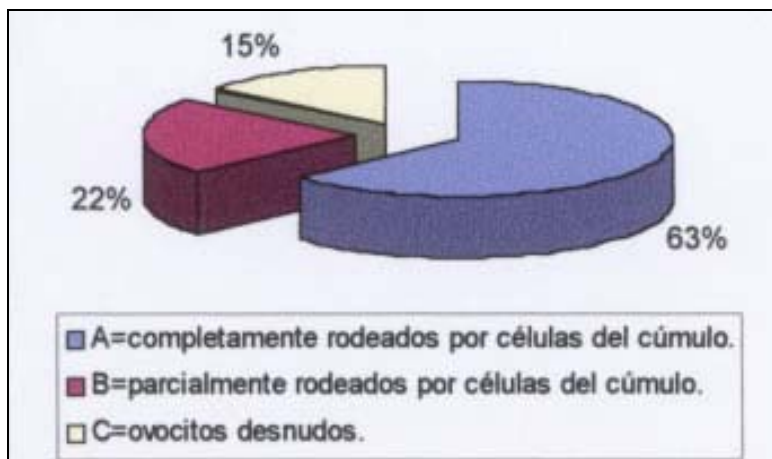


Gráfico 1: Porcentaje de COC obtenidos, según la integridad del cúmulo (n = 155).

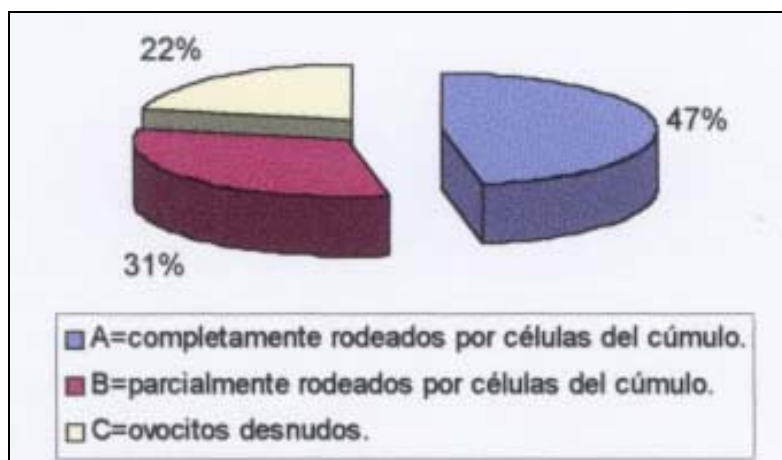


Gráfico 2: Porcentaje de COC obtenidos, según la integridad del cúmulo, de folículos aspirados de 3 a 7 mm (n = 66).

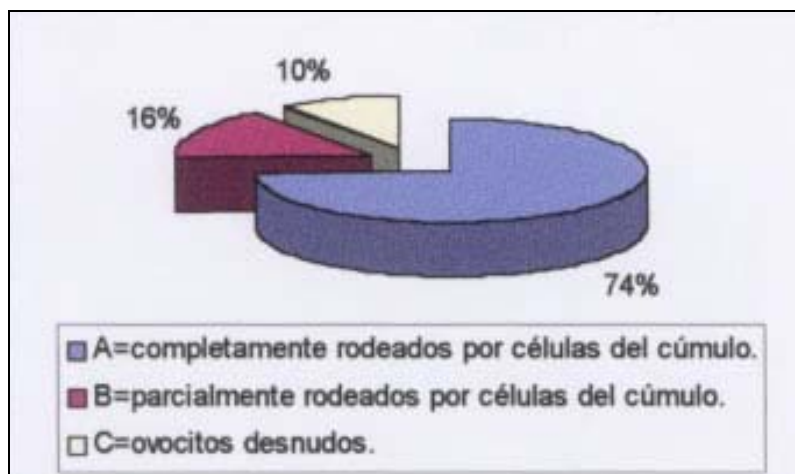


Gráfico 3: Porcentaje de COC obtenidos, según la integridad del cúmulo, de folículos aspirados mayores de 7 mm ($n = 89$).

Según el estado de las células del cúmulo (Fig.. 24, 25), característica asociada con la maduración del ovocito, expandidas, compactas o ausentes. Se observaron las siguientes proporciones (Gráfico 4).

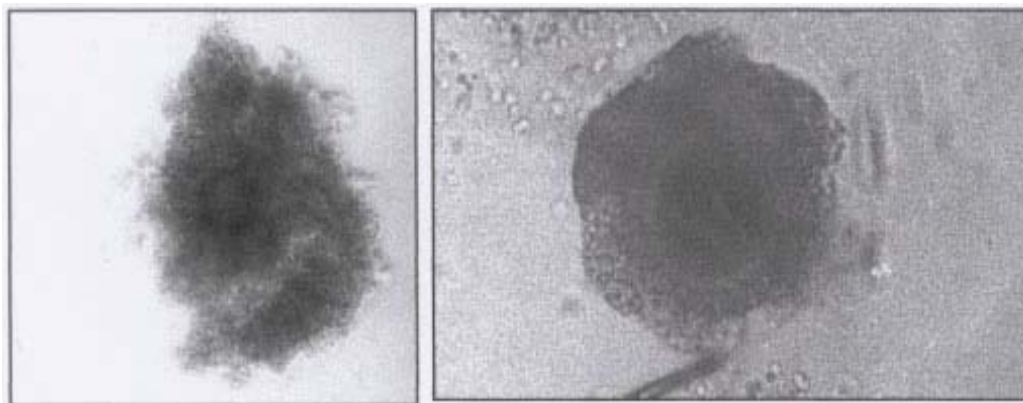


Figura 24: Ovocitos con cúmulos compactos

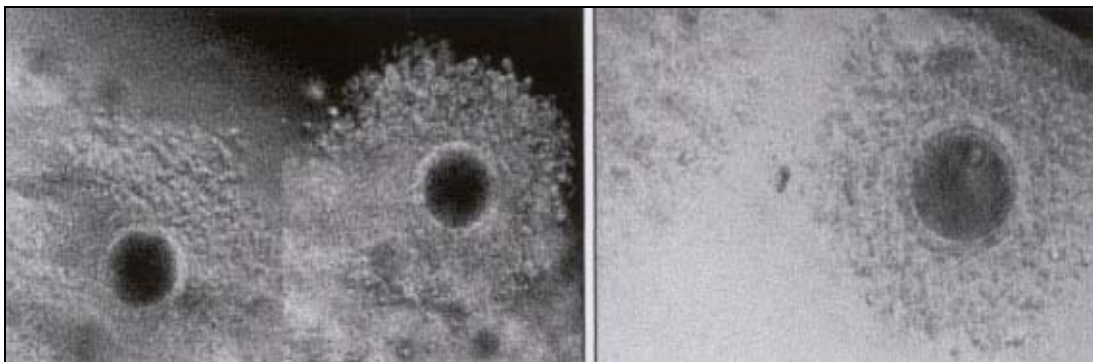


Figura 25: Ovocitos con cúmulos expandidos

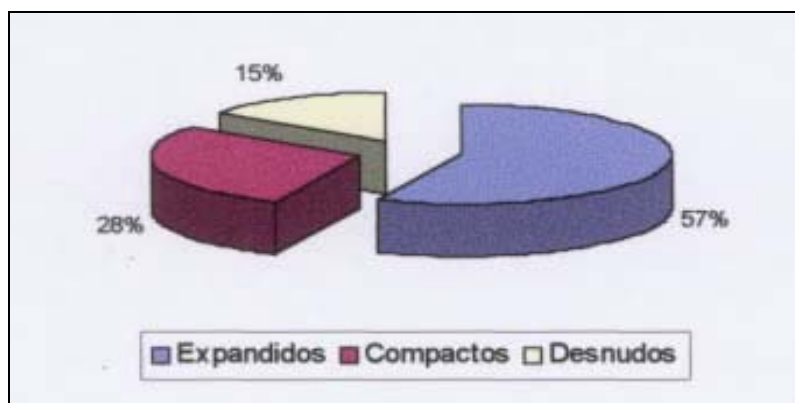


Gráfico 4: Porcentaje de COC obtenidos, según las características del cúmulos (n = 155).

Las relaciones entre las características de integridad del cúmulos (A, B, C), tamaño folicular y madurez de los COC se resumen en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Relación de las características de los COC con el tamaño folicular.

Características	Fol. > 3 a 7 mm	Folículos > 7 mm	Cúmulos expandidos	Cúmulos compactos
A cubiertos	30	68	67	31
B pare, cubiertos	20	14	21	13
C desnudos	14	9		
Cúmulos expandidos	33	54		
Cúmulos compactos	17	28		

Las letras A. B. C de la primera columna hacen referencia a la clasificación de integridad del cúmulos. A Completamente cubiertos por células del cúmulos. B = Parcialmente rodeados por células del cúmulos. C ovocitos desnudos.

6. DISCUSION

Las laparoscopias se realizaron sin dificultades. La combinación de Xilacina y Atropina fue adecuada porque permitió trabajar con tranquilidad y además hubo una rápida recuperación de los animales, facilitando el retorno de las terneras a su lugar de origen dentro de dos horas post operación.

La aguja Yerres, al tener un bisel con la propiedad de ocultarse, facilita atravesar la pared abdominal y proporciona un adecuado pneumoperitoneo, evitando de esta forma dañar algún órgano cuando se introduce trocates o herramientas del laparoscopio. El pneumoperitoneo, tiene por objeto desplazar las vísceras para aumentar el espacio de trabajo entre estas y la pared abdominal.

El desplazamiento de la piel antes de introducir el trocar posteriormente evita suturar la piel disminuyendo el riesgo de exteriorización de alguna víscera y la necesidad de suturar la piel. La aplicación de un spray como desinfectante y cicatrizante, fue suficiente.

Una de las situaciones observada con frecuencia, pese al ayuno, fue que la vejiga de algunas terneras estaban pictóricas de contenido, lo cual dificultaba la observación, ubicación y manipulación del útero y ovarios. Esto se solucionó, desplazando suavemente y en sentido caudal la vejiga, con la superficie dorsal del fórceps. Con este procedimiento la ternera orinaba y se contraía la vejiga, facilitando la visualización y manejo de útero y ovarios.

En ciertas ocasiones, la óptica del laparoscopio se vio borrosa debido a dos causas: la primera era cuando el laparoscopio estaba muy frío en relación con la temperatura interna del animal lo que causaba condensación en el extremo del laparoscopio; esto se remediaba en unos pocos segundos o tocando alguna víscera con el extremo del laparoscopio. La segunda fue cuando se producía una pequeña hemorragia en la pared abdominal, la sangre escurría por el trocar y guía dejando una gota en el extremo del laparoscopio; simplemente limpiando el extremo del laparoscopio se solucionaba este problema.

Se determinó que para hacer llegar la aguja de aspiración al campo visual, era conveniente llegar a este con la punta de la aguja escondida dentro de su trocar, de esta manera se evitó el riesgo de puncionar algún órgano. Luego de ubicado el folículo a puncionar y la punta del trocar de la aguja, se procedía a exteriorizar su bisel para realizar la punción y aspiración folicular.

La heparina suplementada en el medio de lavado folicular funcionó adecuadamente ya que no se observaron adherencias en los ovarios, ni coágulos en el medio recuperado con líquido folicular.

Es importante señalar que no se observaron signos de secuelas internas aparentes a los 60 días de edad, salvo una pequeña cicatriz consolidada a nivel de la piel. Esto hace presumir que la técnica se puede utilizar en animales de alto valor, ya sea por antecedentes genéticos o de raza.

En el Cuadro 1 se puede observar que el tratamiento con gonadotrofinas produjo estimulación del crecimiento folicular; expresada en un número mayor de folículos ($P < 0,05$) en el Grupo 1. Esto significa que las terneras de 40 días de edad responden positivamente al tratamiento con gonadotrofinas, lo que está de acuerdo con lo señalado por Onuma y col. (1969), Seidel y col. (1971), Sciarresi (1984), Silva (1988) y Tervit (1996)

Sin embargo, la hipótesis que un tratamiento previo de gonadotrofinas (40 días de edad) influye positivamente en la respuesta ovárica cuando se hace tratamiento con FSH+eCG a los 60 días de edad no se sustenta puesto que ambos grupos de terneras no presentaron mayores diferencias en el número de folículos observados (Cuadro 2). Estos resultados están en desacuerdo con Armstrong y col. (1992) quienes obtuvieron un desarrollo folicular más alto como respuesta a tratamientos gonadotróficos repetidos.

También es interesante hacer notar que no hubo diferencias en el grupo tratado con FSH+eCG (Grupo 1) a los 40 y 60 días de edad. Este resultado difiere con lo propuesto por Armstrong y col., 1992, quienes reportaron que a medida que se repetían los tratamientos gonadotróficos, las respuestas ováricas eran más altas, y que esto se podría atribuir al factor de mayor edad de las terneras en las intervenciones posteriores.

Irvine y col., 1993, concuerdan con los resultados de este trabajo, ya que realizaron tratamientos gonadotróficos repetidos, y los números de folículos registrados no aumentaron mayormente en los tratamientos consecutivos.

Como puede apreciarse en los Cuadros 2 y 6 una ternera con estimulación gonadotrófica a los 60 días de edad no desarrolló ningún folículo mayor de 7 mm, lo que indica que existe una gran variación individual en la respuesta ovárica, lo cual concuerda con Onuma y col. (1969), Seidel y col. (1971), Armstrong (1993), Bogliatti y col., (1997), Fry y col. (1998), Majerus y col. (1999).

Cabe señalar que en las terneras del grupo control sin estimulación gonadotrófica (Grupo 2) a los 40 días de edad se observó $2,8 \pm 3,6$ folículos mayores de 3 mm (Cuadro 1), lo que indica que a esta edad ya existe actividad ovárica en las terneras prepúberes. Llama la atención el caso de una ternera sin tratamiento del Grupo 2 (Cuadro 8 y 13), en la cual se observó nueve folículos de 3 a 7 mm y uno $>$ a 7 mm. Este tipo de actividad ovárica antes de la pubertad ha sido descrita por Erickson (1966), Seidel y col. (1971), Bederian y Baker (1975) y Evans y col. (1994). Estos últimos determinaron que en terneras de tan sólo 2 semanas de edad, los folículos ováricos se desarrollaban siguiendo el patrón de crecimiento en ondas foliculares, existiendo un aumento con la edad del número promedio de folículos grandes, medianos y pequeños.

En este trabajo se utilizó un protocolo de una inyección única de FSH, lo que hace pensar que quizás, con la utilización de protocolos con inyecciones de FSH múltiples y decrecientes se podría obtener respuestas ováricas más altas.

Parece que el tiempo entre la aplicación (18 hrs) de LH y la aspiración folicular fue adecuado, pese a que en una ocasión se observó la presencia de un cuerpo hemorrágico. Esto concuerda con lo postulado por Armstrong y col. (1992).

El 81,6 % de eficiencia de recuperación de ovocitos (Cuadro 3) puede considerarse alto, si se compara con los porcentajes de 38 % a 68 % Armstrong y col. (1991), 36,5 % a 43,5 % Armstrong y col. (1992), que utilizaron la misma técnica. De igual manera es superior al 38 % de recuperación descrito por Bogliatti y col. (1995), 55 % Pieterse y col. (1991), que utilizaron la técnica de aspiración guiada por ultrasonografía vaginal y 35,3 % de Silva (1988) quien usó laparotomía. Esto probablemente se deba a una adecuada aplicación del método y por una baja viscosidad del líquido folicular (dificultad señalada por Armstrong y col., 1992, cuando utilizaban altas dosis de hCG).

Estos resultados están indicando por lo tanto que el método de aspiración folicular por laparoscopia empleado en esta tesis podría ser un método adecuado para usar en terneras muy jóvenes o menores de 100 kg. Ya que el método de aspiración guiada por ultrasonografía requiere de la fijación manual del ovario por vía transrectal, lo que para animales muy jóvenes es muy difícil. Bogliatti y col. (1995) trabajaron con terneras de 10 semanas, y reportaron grandes dificultades en la fijación de los ovarios. Por su parte Fry y col., (1998) trabajaron sin mayores dificultades con animales de cinco meses y sobre los 100 Kg. de peso.

En lo que respecta a la calidad de los COC recuperados por el método de aspiración folicular por medio de laparoscopia se obtuvo un 63 % de COC clase A, siendo superior en calidad los COC provenientes de los folículos mayores de 7 mm. Esto señala que el método aspiración fue adecuado y la presión aplicada por la bomba de vacío fue lo suficientemente

eficiente para aspirar el líquido folicular y no dañar en gran medida los cúmulos celulares de los ovocitos.

En relación a la maduración *in vivo* de las ova como respuesta a la inyección de LH, en el Cuadro 5 se aprecia una mayor proporción de COC expandidos provenientes de los folículos mayores de 7 mm (54) que de los folículos entre 3 y 7 mm (33).

De lo anteriormente discutido se puede deducir que el próximo paso, es la investigación y desarrollo de técnicas de fecundación *in vitro* eficientes para este tipo particular de gametos, con el fin de obtener embriones transferibles y de buena viabilidad.

De lo expuesto anteriormente se puede concluir que:

1. El método de aspiración folicular a través de laparoscopia en terneras prepúberes permite recuperar COC en un alto porcentaje (81,6).
2. El método puede repetirse con 20 días de diferencia sin señales aparentes de secuelas.
3. No existe un efecto positivo a tratamientos gonadotróficos previos (mayor número de folículos) en la respuesta ovárica de terneras prepúberes.

7. BIBLIOGRAFIA

AVERY, T.L., M.L. FAHNING, E.F. GRAHAM. 1962. Investigations associated with the transplantation of the bovine ova. II Superovulation. *J. Reprod. Féertil.* 3: 212-217. Citado por Sciarresi, LA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

ARMSTRONG, D.T., P. HOLM, B. IRVINE, B.A. PETERSEN, R.B. STUBBINGS, D. McLEAN, G. STEVENS, R.F. SEAMARK. 1991. Laparoscopic aspiration and in vitro maturation of oocytes from calves. *Theriogenology* 35: 182(Abstr.)

ARMSTRONG, D.T., P. HOLM, B. IRVINE, B.A. PETERSEN, R.B. STUBBINGS, D. McLEAN, G. STEVENS, R.F. SEAMARK. 1992. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 38:667-678.

ARMSTRONG, D.T., D. EARL, B. IRVINE, D. McLEAN, G. STEVENS, R.F. SEAMARK. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39: 237 (Abstr.).

BARNES, M.A., S.T. BIERLEY, R.D. HALMAN, D.M. HENRICKS. 1980. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol-17p response in GnRH treated prepuberal holstein heifers. *Biol Reprod.* 22: 459-465. Citado por Sciarresi, LA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

BEDIRIAN, K. N., R. D. BAKER. 1975. Follicular development, oocyte maturation and ovulation in gonadotrophin-treated prepuberal calves. *Can. J. Anim. Sci.* 55: 193, - 199. Citado por Doby, R.T., P. Damiani, C.R. Looney, R. A. Fissore, J.M. Robl. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45: 121 -130.

BETTERIDGE, K.J., C. SMITH, R.B. STUBBINGS, K.P. XU, W.A. KING. 1989. Potential genetic improvement in cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* (Supple 38): 87-98. Citado por Doby, R.T., P. Damiani, C.R. Looney, R.A. Fissore, J.M. Robl. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45: 121 -130.

BOGLIATTI, G.M., C.D. SWAM, G.P. ADAMS. 1995. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. *Theriogenology* 43: 177 (Abstr.).

- BOGLIATTI, G.M., C.D. SWAM, G.P. ADAMS. 1997. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. *Theriogenology* 47: 1253-1264.
- DAVIS, I. C., J. CORREA. 1984 Inducción de superovulación y transferencia de embriones en ovejas. *Agro Sur* 12(1): 6-10.
- DUBY, R.T., J.M. ROBL. 1987. Oocyte collection from gonadotrofin-stimulated calves and their subsequent fertilization in vitro. *J. Anim. Sci.* 65 (Supple):387 (Abstr.).
- DUBY, R.T., P. DAMIANI, C.R. LOONEY, R.A. FISSORE, J.M. ROBL. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45: 121 -130.
- ERICKSON, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25: 800-805.
- EVANS, A. C. O., G. P. ADAMS, N. C. RAWLINGS. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* 102: 463 - 470.
- FRY, R.C., T.L SIMPSON, T.J. SQUIRES. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49: 1077-1082.
- GEORGE, M., J.M. MASSEY 1991. Velogenetics, or the use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology* 35: 151-159. Citado por Duby, R.T., P. Damiani, C.R. Looney, R.A. Fissore, J.M. Robl. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45: 121 - 130
- HAFEZ, E.S.E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ta ed., Interamericana McGraw-hill, México.
- IRVINE, B., D. T. ARMSTRONG, C. EARL, D. McLEAN, R. F. SEAMARK. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39: 237 (Abstr.).
- KAJIHARA, Y., E.G BLAKEWOOD, M.W. MYERS, N. KOMETANI, K. GOTO, R.A. GODKE. 1991. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology* 35(1): 220 (Abstr.).
- KOTARAS, P.J., C.R. EARL, J.M. KELLY, J.P. ROWE, T.M. DE BARRO, D.T. ARMSTRONG. 1995. Pregnancies from in vitro matured and fertilised prepubertal calf oocytes. Serono Int. Symp. On Superovulation and Oocyte Maturation, p. 30. Citado por Tervit, H.R. 1996. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 227-238.

- LEWIS, L, J. OWENS, P. PRIME. 1995. The commercial production of offspring from two to five month old heifers and the effects on later fertility. *Proc. Aust. Soc. Biol.*, 27:29. Citado por Tervit, H.R. 1996. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 227-238.
- LOHUIS, H.H. 1995. Potencial benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43:51-60.
- LOONEY, C.R., P. DAMIANI, B.R. LINDSEY, C.R. LONG, C.L. GONSETH, D.L. JOHNSON, R.T. DUBY. 1995. Use of prepuberal heifers as oocyte donors for IVF: Effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology* 43: 269 (Abstr.).
- MAJERUS, V., R. DE ROOVER, D. ETIENNE, S. KAIDI, A. MASSIP, F. DESSY, I. DONNAY. 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and afterpuberty. *Theriogenology* 52: 1169-1179.
- McDONAL, L.E., 1981. Reproducción y endocrinología veterinaria. 2da ed., Interamericana, México.
- MELLIN, T.N., W.J. O'SHANY, R.D. BUSH. 1975. Induction of follicular growth and ovulation in prepuberal heifers and ewes with synthetic gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology* 4: 41-58. Citado por Sciarresi, LA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- MONNIAUX, D., D. CHUPIN, J. SAUMANDE. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55-81.
- ONUMA, H., J. HAHN, H. FOOTE. 1969. Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of superovulated ova in prepuberal cattle. *J. Reprod. Fert.* 21 : 119- 126.
- PIETERSE, M. C., P. L. A. M. VOS, TH. A. M. KRUIP, Y. A. WURTH, TH. H. VAN BENEDEN, A. H. WILLEMSE, Y. A. WURTH. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35:857-862.
- PRESICCE, G. A. , S. JIANG, M. SIMKIN, L. ZHANG, C. R. LOONEY, R. A. GODKE, X. YANG. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* 56: 386 - 392.
- RENDEL, J.M., A. ROBERTSON. 1950. Estimation of genetic gain in milk yield by selection in a closed herd of dirty cattle. *J. Genetics* 50: 1-9. Citado por Lohuis, H.H. 1995. Potencial benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43:51-60.

REVEL, F., P. MERMILLOD, N. PEYNOT, J.P. RENARD, Y. HEYMAN. 1995. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Fertil.* 103: 115-120.

SCIARRESI, LA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

SEIDEL Jr., G. E., L. L. LARSON, C. H. SPILMAN, J. HAHN, R. H. FOOTE. 1971a. Culture and transfer of calf ova *J. Dairy Sci.* 54 (6): 923 - 925.

SILVA, E. 1988. Estudio de superovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

STUBBINGS, R.B., C. WOSIK, D.T. ARMSTRONG. 1993. Ovarian response on calves to multiple versus a single subcutaneous injection of follitropin. *Theriogenology* 39: 321 (Abstr).

SWANSON, L.V. 1974. Hormone feedback in prepuberal holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 39: 288. Citado por Sciarresi, LA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

TERVIT, H.R., W. McMILLAN, L. McGOWAN, J. SMITH, H. VOGES, P. LYNCH, J. LARSEN, D. HALL. 1995. Follicle development, superovulation and in vitro embryo production from calves. *Proc. Aust. Soc. Reprod. BioL*, 27:1. Citado por Tervit, H.R. 1996. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 227-238.

TERVIT, H.R. 1996. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 227-238.

8. ANEXOS

Cuadro 6: Respuesta ovárica (observaciones) del Grupo 1 a los 40 y 60 días de edad, promedios, varianza, desviación e standar y suma de cuadrados.

Grupo 1 a los 40 días de edad.				Grupo 1 a los 60 días de edad.			
Rp (N°)	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7 mm	Total	Rp (N°)	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7 mm	Total
2249	4	6	10	2249	4	3	7
2256	0	9	9	2256	0	14	14
2264	4	2	6	2264	0	9	9
2266	2	5	7	2266	8	3	11
2267	9	11	20	2267	11	0	11
1395	0	7	7	1395	0	11	11
total	19	40	59	total	23	40	63
promedio	3,2	6,7	9,8	promedio	3,8	6,7	10,5
varianza	11,4	9,9	27,0	varianza	22,6	29,9	5,5
des. Están.	3,4	3,1	5,2	des. Están.	4,8	5,5	2,3
suma cuadra.	57	49	135	suma cuadra.	113	149	28

Cuadro 7: Determinación de diferencias significativas en el Grupo 1 entre las observaciones a los 40 y 60 días de edad, por medio de la prueba de t de Student.

	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7mm	Total
Varianza combinada	17,0	19,9	16,2
Error estándar	2,38	2,57	2,33
t	0,28	0,00	0,29
Valor Critico para t (0.05)	2,228	2,228	2,228

Cuadro 8: Respuesta ovárica (observaciones) del Grupo 1 a los 40 y 60 días de edad, promedios, varianza, desviación estándar y suma de cuadrados.

Grupo 2 a los 40 días de edad.				Grupo 2 a los 60 días de edad.			
Rp (N°)	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7 mm	Total	Rp (N°)	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7 mm	Total
2248	9	1	10	2248	8	4	12
2257	0	3	3	2257	2	3	5
2265	0	1	1	2265	0	3	3
1392	0	1	1	1392	0	5	5
1398	0	1	1	1398	0	9	9
1397	0	1	1	1397	12	5	17
total	9	8	17	total	22	29	51
promedio	1,5	1,3	2,8	promedio	3,7	4,8	8,5
varianza	13,5	0,7	13,0	varianza	26,3	5,0	27,9
des. Están.	3,7	0,8	3,6	des. Están.	5,1	2,2	5,3
suma cuadra.	67,5	3,3	64,8	suma cuadra.	131,3	24,8	139,5

Cuadro 9: Determinación de diferencias significativas en el Grupo 1 entre las observaciones a los 40 y 60 días de edad, por medio de la prueba de t de Student.

	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7mm	Total
Varianza combinada	19,9	2,8	20,4
Error estándar	2,57	0,97	2,61
t	0,84	3,61	2,17
Valor Critico para t (0.05)	2,228	2,228	2,228

Cuadro 10: Determinación de diferencias significativas de las observaciones entre el Grupo 1 y 2 a los 40 y 60 días de edad, por medio de la prueba de t de Student.

Determinación de diferencias entre grupo 1 y 2 a los 40 días de edad.				Determinación de diferencias entre grupo 1 y 2 a los 60 días de edad.			
	Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7mm	Total		Folículos 3 mm a 7 mm	Folículos > 7mm	Total
Varianza combinada	12,4	5,3	20,0	Varianza combinada	24,4	17,4	16,7
Error estándar	2,04	1,32	2,58	Error estándar	2,85	2,41	2,36
t	0,82	4,03	2,71	t	0,06	0,76	0,85
Valor Critico pairajh[0.0g	2,228	2,228	2,228	Valor Critico para t (0.05)	2,228	2,228	2,228

Cuadro 11: Grupo L Tabla de registro de los folículos observados, puncionados y recuperados, por identificación de la ternera,

Rp(N')	Folículos totales			Folículos de 3 a 7mm			Folículos > de 7mm		
	Observados	Puncionados	Recuperados	Observados	Puncionados	Recuperados	Observados	Puncionados	Recuperados
2249	10	10	9	4	4	3	6	6	6
2249	7	7	4	4	4	2	3	3	2
2256	9	9	5	0	0	0	9	9	5
2256	14	14	8	0	0	0	14	14	8
2264	6	9	7	4	6	6	2	3	1
2264	9	9	6	0	0	0	9	9	6
2266	7	7	4	2	2	0	5	5	4
2266	11	11	4	8	8	1	3	3	3
2267	20	20	15	9	9	6	11	11	9
2267	11	11	11	11	11	11	0	0	0
1395	7	7	3	0	0	0	7	7	3
1395	11	11	13	0	0	0	11	11	13
Total	122	125	89	42	44	29	80	81	60

Cuadro 12: Grupo 1: Características y clasificación de los COC por ternera.

Rp(N°)	□ Clase A	□ Clase B	□ Clase C
2249	2gex3gclcex	Igexlcexlcc	
2249	2cc	Igex	lg
2256	4gexlgc		
2256	6gex	Igexlgc	
2264	Igex 4cex	Ice	le
2264	5gex Igc		
2266	4gex		
2266	2gex Igc	Igex	
2267	2gex3gc2cex2cc	2gex Ice	2glc
2267	5cex	2cexlcc	3c
1395	Igx2gc		
1395	5gex2gc	IgexSgc	2g

Clase A: Totalmente rodeado por células del cúmulo.

Clase B: Parcialmente rodeado por células del cúmulo.

Clase C: Ovocito desnudo.

g: Proveniente de folículos > a 7mm .

c: Proveniente de folículos de 3 a 7 mm.

ex: Cúmulos expandido.

c: Cúmulos compacto.

Cuadro 13: Grupo 2. Tabla de registro de los folículos observados, puncionados y recuperados, por identificación de la ternera,

Folículos totales				Folículos de 3 a 7mm			Folículos > de 7mm		
Rp. (N°)	Observados	Funcionados	Recuperados	Observados	Funcionados	Recuperados	Observados	Funcionados	Recuperados
2248	10	10	8	9	9	7	1	1	1
2248	12	12	22	8	8	15	4	4	7
2257	3	2	2	0	0	0	3	2	2
2257	5	5	2	2	2	0	3	3	2
2265	1	1	0	0	0	0	1	1	0
2265	3	3	2	0	0	0	3	3	2
1392	1	1	1	0	0	0	1	1	1
1392	5	3	0	0	0	0	5	3	0
1398	1	1	1	0	0	0	1	1	1
1398	9	9	7	0	0	0	9	9	7
1397	1	1	1	0	0	0	1	1	1
1397	17	17	20	12	12	15	5	5	5
Total	68	65	66	31	31	37	37	34	29

Cuadro 12: Grupo 2: Características y clasificación de los COC por ternera.

N°	□ Clase A	□ Clase B	□ Clase C
2248	Igex2cex2cc	Icex	2c
2248	4gex2gc6cex2cc	3cex3cc	Iglc
2257	2gc		
2257	Igex		lg
2265			
2265	2gex		
1392	Igc		
1392			
1398		Igex	
1398	2gex3gc	Igex	lg
1397			lg
1397	3gex2gclcexlcc	IgcScexlcc	6c

Clase A: Totalmente rodeado por células del cúmulo.
Clase B: Parcialmente rodeado por células del cúmulo.
Clase C: Ovocito desnudo.
g: Proveniente de folículos > a 7mm .
c: Proveniente de folículos de 3 a 7 mm.
ex: Cúmulo expandido.
c: Cúmulo compacto.