

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

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA ASISTIDA POR LAPAROSCOPIA PARA
LA RECOLECCIÓN DE EMBRIONES EN OVEJAS**

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

CLAUDIA ELIZABETH STOCKEBRAND SANDOVAL

VALDIVIA – CHILE
2003

CONTRAPORTADA

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Jorge E. Correa S. _____

COLABORADORES

Dra. Danai Bücher B. _____

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Mario Martinez D. _____

Dra. Lucia Vits D _____

FECHA DE APROBACIÓN

__ 28 de Marzo del 2003 __

Dedicada a todos aquellos que contribuyeron en mi crecimiento personal, muy especialmente a mis Padres y mi recordada abuelita Gume.

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Antecedentes generales	3
3.2. Ciclo estral de la oveja	4
3.3. Transferencia de embriones	4
3.4. Factores a considerar en el proceso de transferencia de embriones	5
3.4.1. Elección de donantes	5
3.4.2. Elección de receptoras	5
3.4.3. Época del año	6
3.4.4. Inducción y sincronización de estros	6
3.4.5. Superovulación	6
3.4.6. Cubierta de hembras donantes	7
3.4.7. Técnicas de recolección de embriones	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1. Material	10
4.1.1. Animales	10
4.1.2. Hormonas utilizadas	10
4.1.3. Material preoperatorio	11
4.1.4. Material para laparoscopia	11
4.1.5. Material para manipulación de embriones	12
4.2. Métodos	13
4.2.1. Sincronización de estros	13
4.2.2. Esquema superovulatorio	13
4.2.3. Servicio de los animales	14
4.2.4. Recolección de ova	14
4.2.4.1. Grupo I. Técnica laparoscópica	15
4.2.4.2. Grupo II. Técnica laparoscópica modificada	16
4.2.5. Observación de ova	17
4.2.6. Análisis estadístico	17
5. RESULTADOS	20
5.1. Presentación de estros	20
5.2. Respuesta superovulatoria	20
5.3. Lavados uterinos	21

5.4.	Recolección de ova	22
5.5.	Tiempos empleados en cada grupo	23
5.6.	Observación y evaluación de los ova	24
6.	DISCUSIÓN	27
6.1.	Sincronización de estros	27
6.2.	Respuesta superovulatoria	28
6.3.	Lavados uterinos	39
6.4.	Recolección de ova	31
6.5.	Evaluación de los ova	32
7.	CONCLUSIÓN	33
8.	BIBLIOGRAFÍA	34
9.	ANEXOS	38

1. RESUMEN.

Con el propósito de facilitar la colocación de la sonda Foley en el cuerno uterino para el lavado de útero en ovejas se realizó una técnica de recolección de embriones con la ayuda de laparoscopia.

Veinte ovejas adultas, Romney Marsh, fueron sincronizadas durante 12 días con dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR®). Se superovularon con FSH en dosis de 175 mg distribuidas en 6 inyecciones intramusculares cada 12 h en régimen decreciente (relación 4:2:1). Con la última dosis de FSH se aplicó 160 UI de eCG, se retiró el CIDR® y comenzó la detección de estros. Iniciado el estro, cada oveja fue expuesta a cubiertas por 3 carneros. Estas cubiertas se repitieron cada 12 h hasta el término del celo.

Seis a siete días posterior al primer servicio las ovejas fueron distribuidas al Grupo I, n = 10, recuperación de embriones mediante laparoscopia y Grupo II, n = 10, recuperación de embriones mediante una técnica que permitió la exposición del cuerno uterino con la ayuda del laparoscopia.

El 100 % de las ovejas tratadas presentó estro, siendo la mayoría dentro de las 24 h siguientes a la remoción del CIDR®. Noventa por ciento de ellas superovularon con un promedio de $7,4 \pm 0,9$ CL por oveja. Se recolectó un total de 33 y 30 ova de los Grupos I y II y el promedio de ova recolectado por oveja fue de 3,3 y 3,8 para cada grupo respectivamente. La eficiencia de recolección de ova para el Grupo I fue de 48,5 % y para el Grupo II fue de 47,6 %.

El 100 % de ova recolectados estuvo fecundados, obteniéndose mórulas compactas (25,4 %), blastocistos expandidos (38,1 %) y blastocistos eclosionados (31,7 %). El grado de calidad embrionaria obtenido en su mayoría fue Grado 1. El tiempo empleado para los Grupos I y II fue de $21,0 \pm 5,1$ y de $31,3 \pm 8,6$ min ($p < 0,05$) respectivamente

La técnica usada en el Grupo II permitió facilitar la colocación de la sonda Foley, recuperar una mayor cantidad de líquido infundido al útero que con la técnica de laparoscopia, sin embargo, el número de embriones fue similar con ambas técnicas, pero se requiere de más tiempo para su ejecución.

Palabras claves: ovejas, CIDR®, FSH, eCG, recolección de embriones, laparoscopia, ova.

2. SUMMARY.

With the aim to facilitate the introduction of Foley catheter into the uterine horn, a embryo collection procedure with the help of laparoscopy was performed in ewes.

Twenty adult ewes Romney Marsh were synchronized by using intravaginal devices with progesterone (CIDR®) for 12 days. 175 mg FSH were injected with 12 h interval divided into 6 doses in a decreasing concentrations manner (4:2:1). 160 IU eCG were injected together with the last FSH injection and withdraw of intravaginal devices, and the estrus detection was started. During the estrus each ewe was mated with three males with 12 h interval.

Six to 7 days after the initial mating the ewes were allowed into two groups, one group was submitted to embryo collection by standard laparoscopy, Group I (n=10), another group was subjected to embryo collection by exposing the uterus horn by laparoscope, Group II (n=10).

All of treated ewes showed estrus. Most of estrus was within 24 h after CIDR® removal. Ninety percent of ewes were superovulated (mean of 7.4 ± 0.9 corpus luteum per ewe). A total of 33 and 30 ova were collected in groups I and II, respectively (mean 3.3 and 3.8 per ewe in group I and II, respectively). The efficiency of ova collection was 48.5 and 47.6 for group I and II, respectively. All of collected ova were fertilized, 25.4% morula, 38.1% expanded blastocyst and 31.7% hatched blastocyst. Most of collected embryos had grade I of quality.

In conclusion, the embryo collection by exposing the uterus horn by laparoscopy facilitated the introduction of Foley catheter into the uterus horn. Although the number of ova were similar between the two procedures, exposing the uterus allow to recover more efficiently of the infused liquid compared to the standard laparoscopy procedure, however, this procedure requires longer time (31.3 ± 8.6 min) than the standard laparoscopy procedure (21.0 ± 5.1 min).

Key words: ewes, CIDR®, FSH, eCG, embryo collection, laparoscopy, ova.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. ANTECEDENTES GENERALES.

La oveja doméstica ha estado asociada al hombre desde tiempos remotos. Su importante contribución tanto en la alimentación (carne, leche) como en la proporción de fibra, la llevó a ser una de las primeras especies de mamíferos en ser domesticada (Gordon, 1997).

Como consecuencia de satisfacer una demanda de mercado mundial, los sistemas productivos han tenido que orientarse a ser año a año más eficientes. Para alcanzar estos objetivos se ha recurrido a la fisiología reproductiva básica, especialmente durante los últimos quince años, donde la oveja se ha convertido en uno de los animales preferidos para la investigación de biotecnologías reproductivas, lo que conllevó a un mejor entendimiento de sus procesos reproductivos (Robertson, 1997).

Existen modernos métodos para potenciar la eficiencia reproductiva de hembras genéticamente superiores. Entre estos métodos se pueden mencionar: producción de embriones *in vitro*, criopreservación, micromanipulación, sexaje, clonación y transferencia de embriones (TE). De las técnicas anteriormente señaladas, es la TE la de mayor desarrollo y difusión (Davis y Correa, 1984; Celestinos, 2003).

La primera TE data del año 1880, cuando Heape transfirió embriones de una coneja a otra, pero no fue hasta 1933, Warwick y Berry utilizaron la técnica por primera vez en ovejas, obteniendo un cordero (Baril y col., 1995). La TE en ovejas se ha venido desarrollando durante los últimos 35 años, durante este tiempo los métodos han ido mejorando considerablemente y una serie de técnicas se han desarrollado para la manipulación y almacenamiento de los embriones (Wilmut, 1987).

La laparotomía se utilizó para la observación de los ovarios en 1961 por Lamond y Urguhart, sin embargo ésta provocaba adherencias que interferían con la posterior fertilidad de los animales. Roberts en 1968 describió una técnica laparoscópica en ovejas y desde entonces esta técnica ha ido adquiriendo una creciente importancia (Pavez y Correa, 1988).

En el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile se ha trabajado en TE en ovinos desde 1971 lográndose el primer nacimiento en Chile de un cordero (Correa, 1972). En Uruguay desde 1987 se ha trabajado en el área de superovulación y TE utilizando laparoscopia como complemento de la técnica y se ha puesto énfasis en la simplificación de ésta para ser utilizada en las explotaciones comerciales (Bonino y col., 1989). Un año mas tarde, Pavez y Correa (1988) utilizaron por primera vez en Chile laparoscopia para el estudio de los ovarios durante el ciclo estral de ovejas.

3.2. CICLO ESTRAL DE LA OVEJA.

La oveja es poliéstrica estacional fuertemente influenciada por el fotoperíodo, presenta ovulación simple o doble dependiendo de la raza. Sus ciclos estrales son de 14 a 18 días, concentrándose la mayoría de ellos entre 16,5 y 17,5 días. Presenta una fase folicular de 2 ó 3 días, correspondiendo el día 0 al comienzo del estro con un pico de LH y su posterior ovulación (Gordon, 1997). La fase luteal se extiende desde el día 2 ó 3, dependiendo del largo de la fase folicular, hasta aproximadamente el día 13. En este momento se gatilla el mecanismo de retroalimentación positiva estrógeno - oxitocina luteal – PGF2 α que culmina con la lisis del cuerpo lúteo y la brusca caída de la progesterona plasmática. La caída de la progesterona plasmática permite el aumento de pulsaciones de GnRH y LH, lo que permite la secreción de estradiol por el ovario, estimulándose el comportamiento estral. El aumento de LH induce ovulación y luteinización, disminuye la secreción de estradiol y se inicia un nuevo ciclo estral (Rubianes y col., 1995).

3.3. TRANSFERENCIA DE EMRIONES.

El término TE tomado literalmente, se refiere solamente a la recolección de un embrión de un animal donante y su colocación en el oviducto o útero de una receptora para completar en este segundo animal la gestación, desarrollo y nacimiento (Kanagawa y col., 1995). Sin embargo, la TE abarca una variedad de procedimientos entre los que podemos mencionar los tratamientos hormonales para sincronizar estro e inducir superovulación, la recolección de embriones, el cultivo *in vitro*, la criopreservación, manipulación y la transferencia de embriones (Maxwell y col., 1990; Cueto y col., 1992).

La TE es un valioso instrumento de investigación. Se ha utilizado en estudios de capacidad uterina, ambiente uterino, reconocimiento materno de la gestación, relación útero – embrionaria y endocrinología de la gestación. La TE también se ha utilizado en estudios de transmisión de enfermedades (Celestinos 2003). La capacidad para manipular la fecundación y modificar el genoma en las primeras fases embrionarias, movería las fronteras del conocimiento de manera nunca imaginada. Sin embargo, la aplicación más práctica de la TE hoy en día es la capacidad para incrementar la eficacia reproductiva de las hembras.

El principal objetivo de la TE, es el incremento de la tasa reproductiva de ovejas en forma similar al rol de la inseminación artificial en el aumento de la tasa reproductiva de los carneros. El incremento de la tasa reproductiva de las hembras permite utilizar al máximo las madres de alto valor genético, utilizándolas únicamente como productoras de ovocitos y/o embriones, dejando el proceso de gestación y parto a hembras de inferior calidad genética (Vivanco, 2000). Una oveja produce a lo largo de toda su vida unos 5 a 7 corderos. Este número se ve limitado por período de gestación y por que sólo se liberan uno o dos óvulos por ciclo estral. Mediante la TE con un tratamiento hormonal de superovulación se pueden obtener 20 y aún más corderos en el año, número impensable usando técnicas tradicionales (Boggio, 2002). De esta manera se consigue un mayor y más rápido mejoramiento genético de una determinada población (Cavestany y col., 1979), lo que permite la creación de nuevos y más eficientes sistemas de producción (Vivanco, 2000).

La TE significó un gran avance en la tecnología reproductiva, creándose la necesidad de evaluar diferentes métodos de recolección de embriones para incrementar la eficiencia global de la técnica (Cueto y col., 1992).

3.4. FACTORES A CONSIDERAR EN EL PROCESO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

La TE consta de diversos pasos que individualmente pueden afectar en forma marcada el resultado final, es decir el número de crías nacidas vivas (Bonino y col., 1989).

3.4.1. Elección de donantes.

La elección de donantes se considera desde el punto de vista del mejoramiento genético (Bonino y col., 1989), basados en índices de producción y de pedigrí (Kanagawa y col., 1995). Es preferible trabajar con animales muy jóvenes para reducir el intervalo generacional, pero las ovejas de edades intermedias constituyen una fuente más apropiada por la mejor calidad de los embriones recolectados (Bonino y col., 1989). Esta selección debe realizarse observando parámetros genéticos, clínicos reproductivos, zootécnicos y sanitarios del animal (Kanagawa y col., 1995).

3.4.2. Elección de receptoras.

Como receptoras se prefieren ovejas con buena condición corporal y de salud, sin problemas mamarios y sometidas a un control sanitario estricto (Bonino y col., 1989; Rubianes y col., 1995). Se prefieren animales adultos que hayan parido (Rubianes y col., 1995). Una buena relación entre receptoras y donantes es de 10 a 1, lo que permite estar cubierto de fallas comunes en la sincronización del estro (Bonino y col., 1989).

3.4.3. Época del año.

La época del año ideal para realizar estos trabajos es durante la estación reproductiva. También se puede trabajar fuera de estación reproductiva, pero se deben aplicar tratamientos hormonales para inducir y sincronizar el estro (Bonino y col., 1989).

3.4.4. Inducción y sincronización de estros.

Es considerado el primer paso crítico en un programa de TE. La sincronización de estro se puede clasificar en métodos farmacológicos y naturales. Los métodos farmacológicos permiten concentrar de manera eficiente la presentación de estros, pero aumentando los costos. Respecto a los métodos naturales, aunque son de muy bajo costo, éstos sólo se pueden utilizar durante la estación reproductiva (Baril y col., 1995).

Los métodos farmacológicos se clasifican de acuerdo a su acción. Un tipo está basado en administrar progestágeno que simula la acción de un cuerpo lúteo, suprimiendo la liberación de gonadotrofinas. Al término del tratamiento, la hipófisis liberará concentraciones crecientes de gonadotrofinas que estimularán el crecimiento de los folículos con la subsecuente ovulación. La duración del tratamiento debe igualar o exceder la vida media del cuerpo lúteo, es decir entre 10 a 14 días (Cueto y col., 1992). El método más conveniente de administración de progesterona es mediante dispositivos intravaginales, los que se mantienen durante 12 a 14 días, manifestándose estro durante las primeras 48 horas posterior al retiro del dispositivo (Letelier, 1997).

Otro tipo está basado en la administración de prostaglandina $F2\alpha$, la que actúa sobre un cuerpo lúteo funcional, produciendo su lisis; por lo que sólo puede utilizarse durante la estación reproductiva (Cueto y col, 1992).

3.4.5. Superovulación.

El factor más crítico que afecta la eficiencia total y los costos de la TE es sin duda “la estrategia superovulatoria”. Esta consiste en inducir en forma artificial la liberación de un mayor número de ovocitos que el número natural y característico para cada especie. En otras palabras, para lograr superovulación se requiere incentivar el “reclutamiento, desarrollo y maduración” de los folículos antrales y contrarrestar cualquier efecto negativo sobre este proceso (Vivanco, 2000).

En un ciclo estral normal, un grupo de folículos inicia su desarrollo hasta que uno de ellos (folículo dominante) bloquea el desarrollo de los demás miembros del grupo. Como consecuencia, el dominante continúa su desarrollo hasta la ovulación, en tanto los demás

folículos comienzan su regresión que termina en atresia. La forma en que el folículo mayor ejerce su dominancia es suprimiendo la síntesis y liberación de FSH por parte de la hipófisis, a través de diferentes formas, pero la más importante es la acción de la inhibina secretada por el folículo dominante (Lucy y col., 1992; Cabodevila, 2000).

El rol de la FSH es el de estimular el desarrollo folicular mediante la promoción de la división celular de las células de la granulosa ovárica y la formación del fluido antral del folículo y en cooperación con la LH regular la actividad estrogénica de las células foliculares. La hormona FSH una vez ligada a su receptor en la superficie de las células de la granulosa ovárica activa una serie de eventos intracelulares que afectan la expresión de los genes determinantes de la proliferación y diferenciación celular (Hillier y col., 1996). El papel clave de la LH es el de transformar el folículo en desarrollo en un folículo estrogénico. Solamente los folículos estrogénicos que han alcanzado un grado suficiente de maduración, de tal manera que tengan alta sensibilidad para responder a las gonadotropinas, pueden pasar por el estadio final de maduración y ovulación (Vivanco, 2000).

La hormona LH es también responsable de la reiniciación de la meiosis en el ovocito y de la síntesis de prostaglandina $F2\alpha$, hormona indispensable en la ruptura del folículo para la ovulación. La ovulación ocurre 24 a 30 h después de la iniciación del pico ovulatorio de LH, el folículo erupciona y el líquido folicular y ovocito son expelidos del ovario (Vivanco, 2000).

La superovulación consiste en administrar gonadotropinas exógenas, que induzcan el crecimiento folicular múltiple (Letelier, 1997). La superovulación en la especie ovina se realiza administrando Gonadotropina Coriónica Equina, eCG (Robinson, 1951; Moore y Shelton, 1964), Extracto Pituitario Anterior Equino, HAP (Moore y Shelton, 1964; Shelton y Moore, 1967; Boland y Gordon, 1982, Araya, 1995), formas purificadas de Hormona Folículo Estimulante, FSH (Wright y col., 1981; Eppleston y col., 1984; Evans y Armstrong, 1984) y Gonadotropina Menopáusica Humana, HMG (Murphy y col., 1984).

3.4.6. Cubierta de hembras donantes.

El servicio se puede realizar a tiempo fijo, sin detección de estro, o a estro visto, cuando las donantes evidencian estro, normalmente 24 a 48 h luego de retirar los dispositivos intravaginales (Bonino y col., 1989; Boggio, 2002). La cubierta de donantes se puede conseguir bien por monta natural, en régimen libre o controlado, o bien por inseminación artificial, con semen fresco o congelado, el que debe introducirse por vía cervical o directamente en el útero mediante laparoscopia (Baril y col., 1995).

3.4.7. Técnicas de recolección de embriones.

Debido a la dificultad de pasar el cervix y la imposibilidad de manipular los cuernos uterinos por palpación rectal, la recolección de embriones es todavía una técnica poco desarrollada en pequeños rumiantes.

La técnica más usada para la recolección de embriones en ovinos es la quirúrgica mediante laparotomía, debido a su eficacia en términos de porcentajes de recolección. El porcentaje de ova recogidos es de 70 % a 90 %, pero disminuye según se va repitiendo la técnica en el mismo animal (Baril y col., 1995).

La laparotomía involucra exteriorizar el tracto reproductivo del animal para proceder con un lavado de los cuernos uterinos y oviducto que puede ser en sentido retrógrado o anterógrado. Los embriones se recolectan mediante lavados de los cuernos uterinos. Para ello se inyecta una solución fisiológica en uno y otro extremo de los cuernos uterinos. El flujo creado por la inyección de esta solución empuja los embriones al extremo opuesto del cuerno uterino, donde se recolectan mediante un catéter. La recolección de embriones se realiza en general al sexto o séptimo día después del inicio del celo.

Debido a que implica manipular el tracto reproductivo, la técnica quirúrgica posee el inconveniente de producir adherencias postquirúrgicas de diversa magnitud en útero, oviducto y ovarios. El grado de adherencias se asocia a la manipulación de oviducto, fimbria y ovario (Boggio, 2002). Estas adherencias pueden provocar infertilidad y esterilidad de las hembras donantes (Nellenschulte y Niemann, 1991). Baril y col. (1995), señalan que el método quirúrgico se aconseja para las donantes sometidas de 1 a 3 recolecciones solamente. Esto debido a que esta técnica disminuye la eficacia de recolección de embriones desde la segunda intervención. Una tercera recolección es poco aconsejable por el alto grado de adherencias existentes, lo que estaría limitando las recolecciones (Boggio, 2002).

Una alternativa que supera estos inconvenientes es la técnica de laparoscopia. Este método fue desarrollado en la oveja con el fin de mejorar las posibilidades de recolección múltiple en hembras donantes (Baril y col., 1995). Es una técnica menos invasiva que se realiza bajo anestesia general (Nellenschulte y Niemann, 1991).

El porcentaje de ova recolectados por laparoscopia es inferior en un 10 % a 15 % a la obtenida por cirugía, pero la repetición de la recolección laparoscópica no disminuye la eficacia (Baril y col., 1995). Vivanco¹, señala que mediante laparoscopia se pueden realizar

¹Vivanco, W., 2002. Comunicación personal.

hasta 7 recolecciones en un año, sin verse afectado el porcentaje de recolección de embriones, pudiéndose repetir estas recolecciones durante varias temporadas. Baril y col. (1995), aconsejan la recolección de embriones por laparoscopia en caso de donantes sometidas a varias recolecciones.

El dominio del laparoscopia es un factor técnico indispensable para el equipo que practica esta técnica, por lo que se debe considerar como otra desventaja (Baril y col., 1995). Otro problema que presenta esta técnica es la manipulación del cuerno uterino con el fórceps aumentando el tiempo utilizado en ella.

Los factores mencionados anteriormente interfieren negativamente en los resultados obtenidos al practicar esta técnica. Esto motiva a desarrollar una variación de la técnica de laparoscopia convencional para evitar estos inconvenientes, y así aumentar la eficiencia de la técnica en cuanto a la recolección de ova y tiempo de recolección empleado.

La técnica laparoscópica para recuperar embriones en ovinos, no ha sido implementada en Chile, por lo que la TE en pequeños rumiantes se ha limitado solo a ensayos experimentales (Chile, 2002). Es por ello que el proyecto financiado por la Fundación para la Innovación Agraria, FIA *“Desarrollo e implementación de transferencia de embriones y producción in vitro de embriones mediante laparoscopia en ovinos”* se desarrolla para implementar técnicas laparoscópicas de recolección y TE.

Dentro de este proyecto, se sitúa la presente memoria de título *“Desarrollo de una técnica asistida por laparoscopia para la recolección de embriones en ovejas”*, como instrumento de evaluación y desarrollo de una técnica alternativa que facilite la obtención de embriones en esta especie.

En base a lo anteriormente planteado se desarrolla la siguiente hipótesis, la exposición del cuerno uterino ayudada por laparoscopia, facilita la colocación de la sonda Foley y el lavado uterino en la recolección de embriones en ovejas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo experimental se realizó durante los meses de Agosto y Septiembre del 2002, en las instalaciones y laboratorios del Instituto de Reproducción Animal (IRA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, ubicados en el campus Isla Teja, Valdivia.

4.1. MATERIAL.

4.1.1. Animales.

Se utilizaron 20 ovejas Romney Marsh adultas, seleccionadas completamente al azar de un rebaño de 60 ovejas previamente individualizadas con un autocrotal numerado. Se registraron los números de cada una de las 20 ovejas seleccionadas.

Se dispuso de tres carneros adultos, dos Romney Marsh y un carnero cruza Suffolk x Austral. Previo a su utilización se les realizó un examen andrológico considerándose aptos para la reproducción.

Las ovejas y carneros se mantuvieron estabulados desde su llegada al campus Isla Teja en el pabellón del IRA. Su alimentación consistió en una ración formulada para suplir requerimientos de mantención de ovejas de 50 kg, ganando 10 gr de peso diarios. La ración consistió en 1,5 kg de heno de pradera natural de potreros de la X Región y 300 gr de concentrado Suralim® ternero en crecimiento, IANSAGRO, Chile.

4.1.2. Hormonas utilizadas.

- Dispositivos intravaginales con Progesterona ¹.
- Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) ².
- Hormona Folículo Estimulante de origen porcino (FSH) ³.
- Prostaglandina F2 α ⁴.

¹ EAZI-BREED, CIDR®, Carter Holt Harvey Plastic Products, New Zealand.

² FOLLIGON®. Laboratorio Intervet, Holanda.

³ FOLLTROPIN-V®, Laboratorio Vetrepharm, Canadá.

⁴ LUTALYSE®, Laboratorio Upjohn, U.S.A.

4.1.3. Material preoperatorio.

- Rasuradora, jabón desinfectante, algodón, alcohol 70°, toalla de papel desechable.
- Pentobarbital Sódico ⁵.
- Atropina, papaverina ⁶.
- Jeringas de 5, 10, 20 y 60 ml.
- Lidocaina 2% ⁷.

4.1.4. Material para laparoscopia.

- Camilla operatoria de sujeción regulable.
- Alcohol de 70°.
- Paños de campo quirúrgicos esteriles.
- Delantales quirúrgicos esteriles.
- Guantes quirúrgicos esteriles.
- Compresas de gasa esteriles.
- Bomba de aire.
- Fuente de luz fría de intensidad variable Storz.
- Cable de fibra óptica.
- Aguja Verres de 13 cm de largo por 2 mm de diámetro.
- Trocar de punta cónica para laparoscopia Storz 26020A de 11 mm.
- Trocar para Fórceps Storz 26172C de 5 mm.
- Guía de laparoscopia.
- Laparoscopia Storz Hopkins 26030B, 30° y guía Storz 26030C.
- Fórceps de sujeción.
- Fórceps de sujeción atraumático.
- Estilete.
- Sonda Foley 10 Fr de 2 vías.
- Pinzas de campo, anatómica y diente de ratón.
- Pinza de oviducto.
- Mango y hojas de Bisturí.
- Porta agujas.

⁵ TIOPENTAL SODICO 1 g®, Laboratorio Chile S.A.

⁶ ATROVERAN®, Laboratorio Chile S.A.

⁷ LIDOCAINA VQ®, Laboratorio Veterquímica Ltda. Chile.

- Agujas de sutura atraumáticas y traumáticas.
- Sutura no absorbible 0,40 mm⁸.
- Tijeras.
- Jeringas de 10, 20 y 60 ml.
- Suero fisiológico.
- Baño de agua con temperatura regulable.
- Medio de recuperación: Solución Ringer lactato enriquecido al 1 % (v/v) con suero ovino.
- Germicida en spray⁹.
- Antibiótico larga acción, Oxitetraciclina¹⁰.

4.1.5. Material para manipulación de embriones.

- Tubos 50 ml con tapa.
- Medio de mantención: Fosfato buffer salino (PBS) 20 % (v/v) suero ovino.
- Platina térmica a 38°C.
- Placas Petri de diferentes tamaños.
- Microscopio estereoscópico.
- Pipeta para manejar embriones.

⁸ VETAFIL BENGEN®, Laboratorio WDT, Alemania.

⁹ LARVISPRAY®, Laboratorio Pfizer, Chile.

¹⁰ OXITETRACICLINA L.A.®, Laboratorio Recalcine S.A., Chile.

4.2. MÉTODOS.

Veinte ovejas se asignaron por sorteo a dos grupos.

Grupo I (n = 10). Recolección de embriones mediante laparoscopia.

Grupo II (n = 10). Recolección de embriones asistida por laparoscopia.

4.2.1. Sincronización de estros.

Se sincronizaron los estros de las ovejas con dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR®). El CIDR® fue mantenido por 12 días, correspondiendo al día 0, el día en que se colocó.

4.2.2. Esquema superovulatorio.

Se aplicó el mismo protocolo superovulatorio para ambos grupos de ovejas. Se administró una dosis total de 175 mg de FSH, distribuidas en seis inyecciones intramusculares (i.m.) cada 12 h, comenzando con la primera dosis a las 09:00 am del día 10 de colocado el dispositivo intravaginal y bajo un régimen decreciente (relación 4:2:1). La sexta inyección coincidió con la remoción de los dispositivos intravaginales el día 12 y con la aplicación de una dosis única de 160 UI de eCG vía i.m. Las dosis de FSH aplicadas en el tratamiento superovulatorio se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Esquema superovulatorio con FSH (Folltropin V®) los días 10 – 12 de aplicado el dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR®).

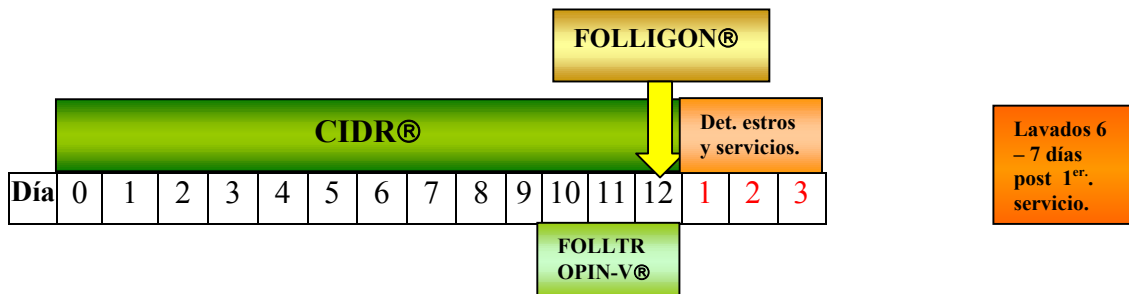
	Hora administración	Inyección	Dosis de FSH (mg NIH-FSH-P1)
Día 10	09:00	1	50,0
	21:00	2	50,0
Día 11	09:00	3	25,0
	21:00	4	25,0
Día 12	09:00	5	12,5
	21:00	6	12,5

4.2.3. Servicio de los animales.

Desde el momento en que se retiró el dispositivo intravaginal (día 12), se procedió a detectar estros con un carnero celador. Este celador fue uno de los mismos carneros reproductores, provisto de un arnés que le impidió la cópula (Figura 1). Las ovejas que presentaron estro fueron apartadas a un corral donde un macho dispuso de 30 m para cubrirlas (Figura 2). Luego un segundo macho tuvo la oportunidad y finalmente fueron expuestas a un tercer macho, durante 30 m cada uno. De esta manera, las ovejas fueron cubiertas por los 3 machos. Se repitieron los servicios cada 12 h hasta finalizado el estro. Se registró la hora de inicio y término del estro, correspondiendo ésta al momento en que la oveja fue detectada por primera vez en calor y a la última aceptación de la monta respectivamente. También se registró el inicio del estro, número de servicios efectuados por oveja (Anexo 1 y 2).

En la Figura 3 se resume la metodología utilizada para la sincronización de estros, superovulación, detección de estros, servicios y recolección de ova.

Figura 3: Tratamientos hormonales, detección de estros, servicios y recolección de ova.



4.2.4. Recolección de ova.

Seis a siete días posteriores al primer servicio, se procedió a la recolección de embriones de acuerdo a la técnica correspondiente a los Grupos I y II respectivamente.

Cada oveja fue sometida a un ayuno de 24 h previo a la recolección. Se rasuró la región abdominal desde apéndice del xifoideas hasta glándula mamaria y desde pliegue del ijar derecho hasta pliegue del ijar izquierdo, zona que fue lavada con jabón germicida y desinfectada con alcohol.

Se colocó la oveja en posición decúbito dorsal, sobre una camilla reclinable (Davis y Correa, 1984) y se inmovilizó. Se continuó con la administración de premedicación vegetativa, Atroveran® en dosis de 0,04 mg/kg intramuscular. Transcurridos 5 a 10 minutos se continuó con la preparación del animal para la anestesia (Figura 4). Se administró Tiopental Sódico® vía intravenosa en dosis de 250 mg aplicados en bolo, continuando con administración a dosis efecto. El rango total de anestésico aplicado fue de 375 a 750 mg. La oveja ingresó al pabellón de cirugía anestesiada. Se preparó el campo operatorio, desinfectando con alcohol. La camilla se llevó a una posición de 45° de ángulo con el suelo, con la cabeza del animal hacia abajo (Figura 5). La oveja fue cubierta totalmente con un paño de campo estéril.

En una ficha (Anexo 3), fueron registrados; número de arete de cada oveja, fecha de la intervención y técnica aplicada. También el procedimiento preanestésico y hora de aplicación; anestesia utilizada, cantidad y hora de aplicación.

4.2.4.1. Grupo I. Técnica laparoscópica.

A través de una aguja Verres, con la que se perforó el abdomen 4 a 5 cm craneo lateral a la glándula mamaria, se indujo neumoperitoneo con aire comprimido (Figura 6). Este momento se consideró como el inicio de la intervención y se registró la hora en una planilla (Anexo 3). Una vez insuflado el abdomen, mediante un trocar de punta cónica se perforó la pared abdominal 6 a 10 cm craneal a la glándula mamaria y 2 a 4 cm hacia la izquierda de la línea media. Se prosiguió a retirar la parte central del trocar por donde se introdujo la guía con el laparoscopio, el que se conectó por medio de un cable de fibra óptica al generador de luz fría.

A continuación se perforó la pared abdominal mediante un segundo trocar, 2 a 4 cm a la derecha de la línea media y paralelo al primer trocar, el que se retiró y por el orificio realizado por el trocar se introdujo el fórceps con el que se manipuló el útero (Figura 7). El útero se tomó por la base de uno de los cuernos exponiendo su curvatura mayor (Figura 8). Se observó los ovarios y se evaluó la respuesta superovulatoria. Se registró en una planilla (Anexos 6 y 9) la respuesta ovárica para cada oveja. Solo si hubo multiovulación, (más de 2 cuerpos lúteos, [CL]), se prosiguió con la intervención. Se utilizó el segundo trocar (el mismo con el que se perforó la cavidad abdominal para introducir el fórceps), por el que se dirigió un estilete con el que se perforó uno de los cuernos uterinos 1 a 2 cm de su bifurcación. Por este orificio se introdujo una sonda Foley 10 Fr de dos vías. Ubicada la sonda en el interior del útero se llenó el balón de la sonda con 1,5 a 3 ml de suero fisiológico, anclando de esta manera el balón en la luz del cuerno (Figura 9). Mediante el fórceps se ocluyó el cuerno uterino cercano a la unión útero tubárica y se procedió a infundir mediante una jeringa conectada a la sonda 10 a 20 ml de suero Ringer lactato enriquecido al 1% (v/v) suero ovino (Figura 10). Posteriormente se recuperó el medio infundido mediante la misma jeringa. Se facilitó esta maniobra realizando movimientos del cuerno uterino con el fórceps. El medio

recuperado se depositó en tubos con tapa, registrándose la cantidad recuperada. Se realizó un segundo lavado del mismo cuerno. Terminando esta maniobra, con el fórceps liberado se ubicó el otro cuerno y se repitió todo el procedimiento. En Anexos 6 y 9 se registró la cantidad de medio infundido y recuperado en cada lavado de cada cuerno por oveja. Los tubos se mantuvieron en una platina templada a 35° C hasta la búsqueda de los ova.

Cuando finalizó el lavado de los cuernos, se retiró el instrumental y se ayudo a la salida del aire desde la cavidad abdominal presionando el abdomen. Se registro en una planilla la hora de finalización de la intervención que correspondió al momento en que se retiró el último trocar. Se aplicó Larvispray® sobre las perforaciones por donde se introdujeron los trócares y se inyectó Oxitetraciclina LA® como antibiótico de larga acción en dosis de 20 mg/kg vía i.m. Además, se aplicó 5 mg/kg de Lutalyse® subcutáneo (s.c.) para inducir luteolisis y evitar preñez por algún embrión no removido del útero.

4.2.4.2. Grupo II. Técnica asistida por laparoscopia.

La metodología utilizada para la inducción de neumoperitoneo, colocación del primer trocar y registro de la hora de inicio de la intervención fue idéntica a la descrita para el Grupo I. Con el segundo trocar se perforó la pared abdominal en la línea media quedando ubicado 2 a 4 cm del primer trocar, paralelo a éste. A través de este trocar se introdujo un fórceps con el que se manipuló el útero por la base de uno de sus cuernos. Se registró en una planilla (Anexo 3 y 6) la respuesta ovárica para cada oveja. Comprobando que había más de 2 CL se retiró el fórceps y segundo trocar de la cavidad abdominal. Se hizo una incisión 10 a 14 cm de la glándula mamaria de 3 a 4 cm en la línea alba, por la que se introdujo un fórceps atraumático con el que se tomó y traccionó el cuerno uterino. La exteriorización completa desde la cavidad abdominal se realizó traccionando el cuerno con dos dedos. Desde este momento se irrigó los cuernos con suero fisiológico.

Se colocó una pinza de oviducto en el extremo del cuerno uterino proximal al oviducto. Se perforó el cuerno uterino, 1 a 2 cm de su bifurcación con un estilete. Por este orificio se introdujo una sonda Foley 10 Fr de dos vías hasta la luz uterina. Se llenó el balón de la sonda con 1,5 a 3 ml de suero fisiológico y una vez firme y bien anclado a las paredes del cuerno, se prosiguió infundiendo medio (Figura 11). Se utilizó suero Ringer lactato enriquecido al 1 % (v/v) con suero ovino, del que se infundieron 10 a 20 ml mediante una jeringa conectada a la sonda. Se realizó un masaje suave en sentido anterógrado con el fin de facilitar la recuperación del medio infundido. El medio se recuperó mediante la misma jeringa (Figura 12) y su contenido fue depositado en tubos con tapa. Este procedimiento se repitió 2 veces. Los tubos se mantuvieron en una platina templada a 35° C hasta la búsqueda de ova. Una vez finalizado el lavado del cuerno uterino, se retiró el suero fisiológico del balón y se retiró la sonda Foley. Fue devuelto el cuerno uterino a la cavidad abdominal. El procedimiento se repitió en el otro cuerno uterino. En Anexos 6 y 9 se registró la cantidad de medio infundido y recuperado en cada lavado de cada cuerno uterino por oveja.

Una vez reintroducidos los cuernos uterinos en la cavidad abdominal, se suturó un plano interno que incluyó peritoneo y fascia y otro externo para piel (Figura 13). En cada plano se realizó un punto en U vertical. En una planilla (Anexo 3) se registró la hora en que finalizó la intervención. Esta correspondió al momento en que se terminó de suturar la piel.

Sobre los puntos de la piel se aplicó Larvispray® y se inyectó Oxitetraciclina LA® en dosis de 20 mg/kg de peso corporal vía i.m. Se aplicó una dosis s.c. de 5 mg/kg de Lutalyse® para inducir luteolisis y evitar preñez.

4.2.5. Observación de los ova.

Finalizada la intervención, se llevó el medio recolectado y debidamente identificado a placas Petri. Esta fue observada para búsqueda de ova mediante un microscopio estereoscópico 20 X a 40 X. Se registró la cantidad de ova observados, estado de desarrollo y su calidad (Anexo 4).

El grado de calidad y desarrollo de los ova recolectados se evaluó de acuerdo a la pauta de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Linder y Wright, 1983).

4.2.6. Análisis estadístico.

Las diferencias entre cantidad de medio infundido y recuperado, cantidad de embriones recolectados y tiempo empleado para ambas técnicas fueron sometidos a una prueba de t de student con un nivel de significancia del 5 %. Para llevar a cabo el análisis se utilizó el programa computacional Statgraphics 2.0 y Excel 2000.



Figura 1: Carnero celador con chaleco que impide la cópula.



Figura 2: Encaste de ovejas donantes.



Figura 4: Preparación para anestesia.



Figura 5: Oveja en camilla reclinable.



Figura 6: Colocación de la aguja Verres para producir neumoperitoneo.



Figura 7: Laparoscopia convencional.

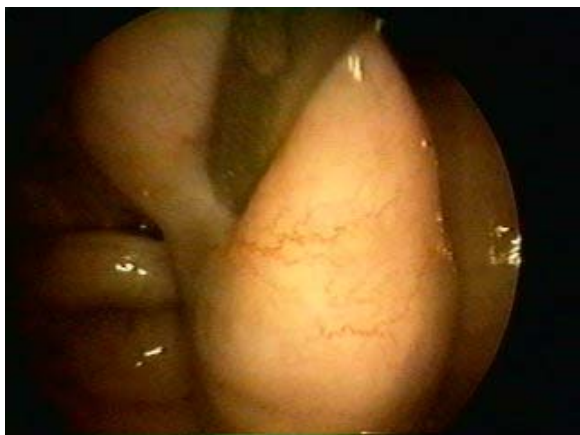


Figura 8: Sujeción de cuerno con Forceps atraumático mediante laparoscopia.



Figura 9: Colocación de sonda Foley en cuerno uterino por laparoscopia.



Figura 10: Lavado uterino por laparoscopia convencional.



Figura 11: Lavado uterino exteriorizando cuernos.



Figura 12: Recuperación del medio con exteriorización de cuernos uterinos.



Figura 13: Sutura de piel.

5. RESULTADOS.

5.1. PRESENTACIÓN DE ESTROS.

Las 20 ovejas presentaron estro con una longitud de 42 h (Anexo 2). Una oveja del Grupo I (10 %) y tres ovejas del Grupo II (30 %) no presentaban el dispositivo intravaginal al momento de su retiro.

El 100 % de las ovejas presentó estro antes de las 48 h de retirado el CIDR®. La duración del estro fue de $42 \pm 16,7$ h (promedio \pm D.E.), observándose que en un 70 % de las ovejas el estro duró entre 36 y 48 h.

El 85 % de las ovejas fueron cubiertas por los tres carneros. La cantidad de servicios promedio por oveja fue de 7,8 (detalle en Anexo 2).

5.2. RESPUESTA SUPEROVULATORIA.

Las 20 ovejas ovularon. En el Grupo I el 100 % de las ovejas superovularon (presentaron más de 2 CL). En el Grupo II, 80 % de ovejas superovularon y dos ovejas presentaron solo 1 CL (consideradas no superovuladas). De acuerdo al esquema preestablecido, a estas 2 últimas ovejas no se les realizó lavado uterino, siendo excluidas de los resultados del trabajo con embriones.

La respuesta superovulatoria fue de $7,4 \pm 0,9$ con un rango de 3 – 17 CL y de $0,5 \pm 0,0$ folículos mayores a 9 mm con un rango de 1 – 4 folículos. Estos datos se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Respuesta superovulatoria en ovejas tratadas con FSH (n = 18).

GRUPO	Cuerpos lúteos		Folic. > 9 mm.		Respuesta ovárica	
	X ± D.E.	RANGO	X ± D.E.	RANGO	X ± D.E.	RANGO
I (n = 10)	6,8 ± 3,9	3 – 17	0,5 ± 0,5	1 – 4	7,2 ± 4,1	1 – 17
II (n = 8)	8,1 ± 3,7	3 – 15	0,5 ± 0,8	1 – 3	8,6 ± 3,2	1 – 15
PROMEDIO	7,4 ± 0,9	3 – 17	0,5 ± 0,0	1 – 4	7,9 ± 3,7	1 – 17

5.3. LAVADO UTERINO.

En el Grupo I se infundió al cuerno uterino una cantidad promedio de 12,4 y 11,9 ml de líquido de lavado por oveja correspondientes al primer y segundo lavado respectivamente. Del medio infundido se recuperó 8,7 y 8,4 ml promedio por oveja en el primer y segundo lavado respectivamente. Para el Grupo II se infundió una cantidad promedio de 11,4 y 11,1 ml de líquido por oveja en el primer y segundo lavado respectivamente. De este medio infundido se recuperó un promedio de 8,8 y 9,2 ml por oveja en el primer y segundo lavado respectivamente. Hubo dificultad al extraer el líquido de lavado de un cuerno uterino en 2 ovejas del Grupo I y en una oveja de Grupo II, recuperando solo una pequeña cantidad del líquido infundido.

No hubo diferencias significativas entre la cantidad de medio infundido para los Grupos I y II y de medio recuperado para ambos grupos ($p > 0,05$).

En el Cuadro 2 se observa las cantidades y porcentajes de líquido infundido y recuperado de cada lavado por grupo respectivamente.

Cuadro 2: Cantidades y porcentaje de líquido infundido y recuperado de cuernos uterinos mediante laparoscopia (convencional y modificada) de ovejas superovuladas con FSH.

GRUPO	1 ^{er} Lavado		2 ^o Lavado		Promedio		Porcentaje recuperación de líquido.
	ml infun	ml recup	ml infun	ml recup	ml infun	ml recup	
I (n = 10)	12,4	8,7	11,9	8,4	12,1	8,5	70,2
II (n = 8)	11,4	8,8	11,1	9,2	11,3	9,0	79,6
PROMEDIO	11,9	8,8	11,5	8,8	11,7	8,7	74,4

5.4. RECOLECCIÓN DE OVA.

De las 18 ovejas que se les efectuó lavado uterino se recolectó un total de 63 ova, recuperándose 33 y 30 ova en los Grupos I y II, siendo estas diferencias no significativas ($p > 0,05$). El promedio total de ova recolectados por oveja fue de $3,6 \pm 0,4$ con un rango de 0 - 11. Para los Grupos I y II se recuperó $3,3 \pm 2,4$ ova (rango 0 - 8) y $3,8 \pm 3,9$ (rango 0 - 11) respectivamente.

La eficiencia de recolección de ova, calculada en relación a CL observados y ova recolectados, fue de 48,5 % y 47,6 % para el Grupo I y II respectivamente. La eficiencia total de recolección (ambos grupos) fue de 48,1 %.

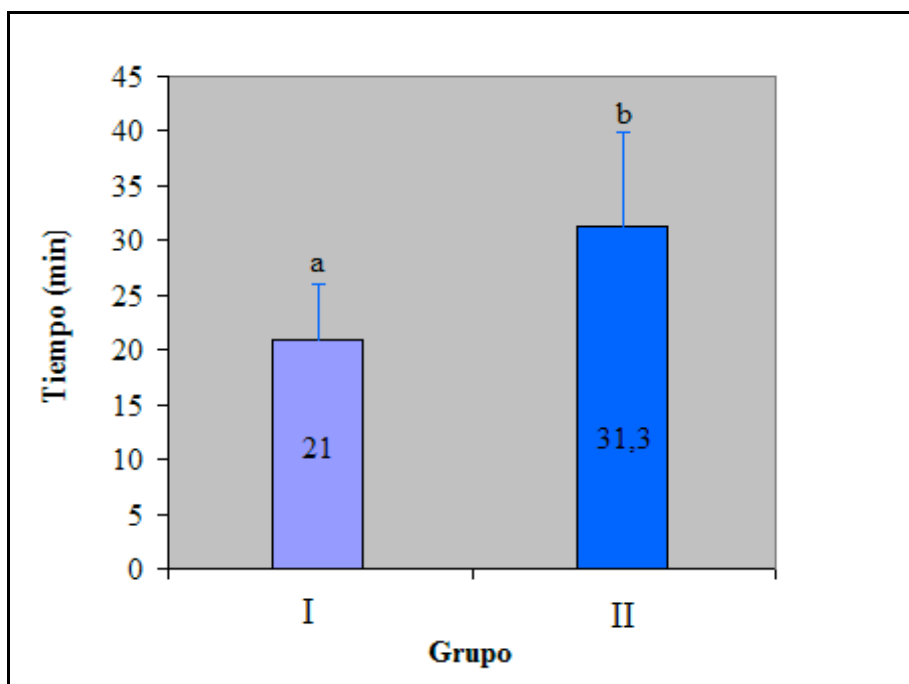
En el Cuadro 3 se resumen los resultados obtenidos en la recolección de embriones en las ovejas que se les realizó lavado uterino.

Cuadro 3: Resultados de recolección de embriones en ovejas superovuladas con gonadotrofina mediante dos técnicas (n = 18).

GRUPO	Total ova recolectados por grupo	Total CL observados por grupo	Promedio ± D.E. de ova recolectados por oveja	Rango de ova recolectados por oveja	Eficiencia de recolección de ova (ova rec/cl) x 100
I (n = 10)	33	68	3,3 ± 2,4	0 – 8	48,5
II (n = 8)	30	63	3,8 ± 3,9	0 - 11	47,6
TOTAL	63	131	3,6 ± 0,4	0 - 11	48,1

5.5. TIEMPOS EMPLEADOS EN CADA GRUPO.

El tiempo promedio empleado para la recolección de embriones (Gráfico 1) por el método laparoscópico realizado al Grupo I fue de $21 \pm 5,1$ min y $31,3 \pm 8,6$ min para el método laparoscópico realizado al Grupo II, siendo estas diferencias significativas ($p < 0,05$). Los tiempos empleados se detallan en el Anexo 6.



Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Gráfico 1: Tiempos (min) promedio y desviación estándar para cada una de las técnicas de recolección de embriones y su significancia estadística.

5.6. OBSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS OVA.

Del total de 63 ova recuperados el 100 % de ellos estaban fecundados. La distribución y desarrollo de los embriones se presenta en el Cuadro 4.

El estado de desarrollo de los embriones recuperados varió entre mórula y blastocisto eclosionado.

Cuadro 4: Cantidad y porcentaje (%) de ova recolectados según estadio de desarrollo para los Grupos I y II y totales.

Estadios de desarrollo		GRUPO I n = 10	GRUPO II N = 8	TOTAL n = 18
Mórula	Total	1	2	3
	%	3	6,7	4,8
Mórula compacta	Total	7	9	16
	%	21,2	30	25,4
Blastocisto expandido	Total	14	10	24
	%	42,4	33,3	38,1
Blastocisto eclosionado	Total	11	9	20
	%	33,3	30	31,7
Total		33	30	63
%		52,4	47,6	100

La clasificación de los embriones recuperados de a cuerdo con su calidad se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Cantidad total y porcentaje (%) de ova recolectados según grados de calidad en Grupos I y II.

GRUPO	GRADO 1		GRADO 2		GRADO 3		GRADO 4		TOTAL	%
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%		
I (n = 10)	21	63,6	6	18,2	3	9,1	3	9,1	33	52,4
II (n = 8)	17	56,7	8	26,7	3	10	2	6,7	30	47,6
TOTAL	38	60,3	14	22,2	6	9,5	5	7,8	63	100

Grado 1 = Excelente. Grado 2 = Bueno. Grado 3 = Regular. Grado 4 = No transferible.

La clasificación detallada de los estados de desarrollo y grado de calidad de los embriones recolectados en el Grupo I y Grupo II se resume en el Anexo 5.

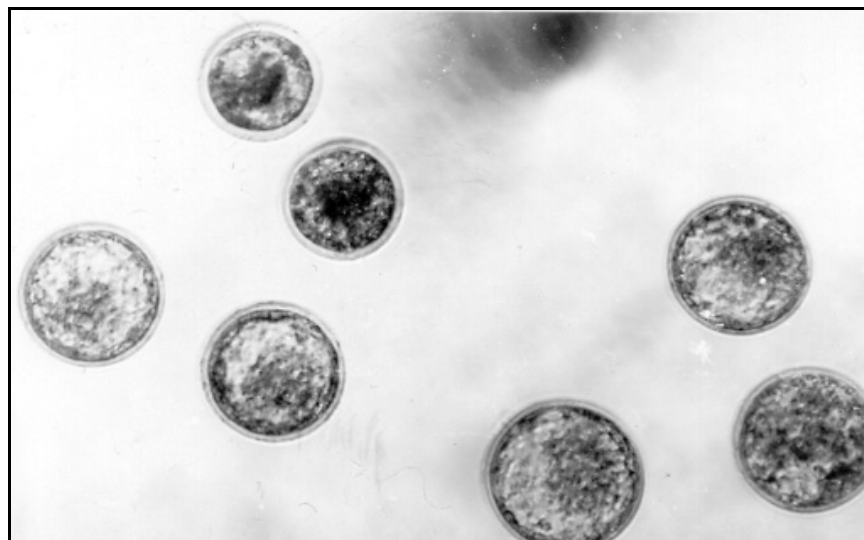


Figura 14: Blastocistos recuperados desde una oveja superovulada con FSH.

6. DISCUSIÓN.

6.1. SINCRONIZACIÓN DE ESTROS.

El 100 % de presentaciones de estro obtenido en estas ovejas indica que el CIDR® es un adecuado método para sincronizar estros en ovejas. Resultados similares han sido descritos por Boggio (1997, 2002) y ligeramente menores por Letelier (1997) y Rubianes y col. (2002) con un 90 % y 95,9 % de presentaciones de estro respectivamente. Con otros dispositivos como esponjas vaginales impregnadas con progestágenos sintéticos se han logrado resultados similares. Nellenschulte y Niemann (1991) y Bari y col. (2001) obtuvieron un 95,2 y un 100 % de presentaciones de estro utilizando esponjas impregnadas con acetato de fluogestona. Wright y col. (1981), utilizando acetato de medroxiprogesterona también lograron un 100 % de estros.

La progesterona o progestágenos ejercen un efecto de retroalimentación negativa en la secreción de gonadotrofinas llegando éstas a niveles basales. Sin embargo una vez que este dispositivo se retira los niveles de progesterona caen provocando un incremento en la secreción de gonadotrofinas hipofisarias que facilitan la presentación de estro y posterior ovulación (Vivanco, 2000). Los dispositivos CIDR® presentan un diseño en forma de Y que permite el anclaje de éstos a la vagina; sin embargo en este experimento se observó pérdida de dispositivos en 4 ovejas (20 %) no afectando la presentación de estros. Esto lleva a pensar que la pérdida de los dispositivos se produjo tarde, cercana al día en que debieran retirarse los CIDR®. La caída de los 4 dispositivos se puede atribuir; ya sea a que en el momento de su aplicación, no quedaron correctamente ubicados dentro de la vagina o a una pérdida de los mismos provocado por la manipulación de los animales durante la aplicación de los tratamientos superovulatorios. Vivanco (2000), Boggio (1997) y Devincenzi y col. (1995) obtuvieron un 100 % de mantención del CIDR®. Fukui (1993) obtuvo un 98,8 % de mantención del dispositivo.

De las 3 ovejas que presentaron estro al momento de retirar el CIDR®, dos de ellas llevaban el dispositivo puesto. Este suceso puede explicarse por una marcada baja en el nivel de progesterona en la sangre que se observa a partir del día 8 de colocado el CIDR® (Vivanco, 2000). Con respecto a la oveja a la que no se le encontró el CIDR® al momento de su retiro (día 12), es probable que ésta haya perdido el CIDR® muy cercano a este momento.

La mayor cantidad de ovejas en estro se logró a las 24 h de retirado el CIDR®, resultado que está dentro de lo esperado en ovejas sometidas a este tipo de tratamiento (Devincenzi y col., 1995; Vivanco, 2000).

El promedio de inicio de la presentación de estro obtenido en este estudio fue de 18 h (Anexo 2). Este promedio es ligeramente menor al obtenido por Letelier (1997), Vivanco (2000) y Boggio (1997, 2002). Este promedio menor probablemente se deba a que el 15 % de las ovejas ya estaban en estro al momento en que se detectó éste por primera vez.

La duración del estro obtenida en este trabajo (42 h) es mayor a la observada en ovejas sin tratamiento alguno. El estro espontáneo de la oveja dura entre 24 a 36 h (Hafez, 1996), periodo en el cual ovula 1 a 2 ovocitos. Sin embargo, en un tratamiento superovulatorio donde hay un mayor número de folículos destinados a ovular, es probable que se produzca un alargamiento del estro debido a una mayor cantidad de estrógenos producida por la eCG (Vivanco, 2000).

6.2. RESPUESTA SUPEROVULATORIA.

En relación a la respuesta superovulatoria, se obtuvo un promedio de 7,4 CL por oveja y una desviación estándar que indica un estrecho margen de variación. Este resultado es muy similar al obtenido por Vivanco (2000) que utilizó un protocolo de superovulación semejante. Esta respuesta ovárica es la que se desea obtener con un tratamiento superovulatorio en un programa de TE. Si se lograra repetir este tipo de respuesta estaríamos acercándonos a un tratamiento ideal para la oveja. En cuanto al promedio obtenido éste es similar al descrito por Letelier (1997) y Bonino y col.(1989), sin embargo la D.E. obtenida por estos autores fue mayor, siendo por lo tanto mas variable.

El bajo número de folículos mayores de 9 mm indica que la dosis FSH usada fue adecuada, obteniendo una respuesta ovulatoria que puede considerarse uniforme a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza eCG sola. Por otro lado la adición de eCG en dosis baja y al final del tratamiento con FSH fomentó la expresión del estro (Vivanco, 2000). Además el uso de FSH y eCG no incrementó el número de folículos persistentes mejorando la respuesta superovultoria, que se evidencia en un mayor número de ova recuperado (Vivanco, 2000). Esto podría explicar la adecuada respuesta obtenida en este trabajo.

Debe mencionarse que se han utilizado diversos tratamientos superovulatorios, obteniéndose resultados muy variados. Esto indicaría que la respuesta ovárica no solo depende de los diferentes protocolos y hormonas, sino también de factores medioambientales y características individuales (Kanagawa y col., 1995). Por ejemplo Boggio (2002) señala que

las mejores respuestas superovulatorias se obtienen con 200 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V® ($9,5 \pm 4,9$ CL) o 56,25 mg NIH-FSH-S1 de Super-Ov® ($6,5 \pm 4,7$ CL) administrados una vez por día durante tres días. Wright y col. (1981) utilizaron protocolos de superovulación con FSH sola obtuvieron $8,2 \pm 5,6$ y utilizando FSH + LH obtuvieron $8,9 \pm 5,8$ CL. Nellenschulte y Niemann (1991) utilizando eCG y FSH obtuvieron un promedio de $4,7 \pm 4,6$ CL. Davis y Correa (1984) utilizando una sola dosis de 1000 UI de eCG obtuvieron una ovulación promedio de 3 CL por oveja tratada. Además los tratamientos actuales actúan sobre los folículos reclutables que ya han pasado del estadio germinativo inicial al de crecimiento. Por lo tanto, la respuesta del tratamiento va a depender del número de folículos reclutables en el ovario al inicio del tratamiento (Baldassarre, 1995). Vivanco (2000) señala que la gran variabilidad en las respuestas a los tratamientos superovulatorios es considerada como el factor más limitante de la transferencia embrionaria.

6.3. LAVADOS UTERINOS.

El ayuno de 24 h al que fueron sometidas las ovejas, facilitó la perforación de la cavidad abdominal mediante los trócares y evitó la regurgitación del contenido ruminal y eventual asfixia.

La utilización de Tiopental Sódico® proporcionó una anestesia segura, suficientemente profunda y de duración adecuada para el desarrollo de ambas técnicas. El uso de Atropina® como premedicación vegetativa permitió la relajación de la musculatura lisa y disminución de las secreciones. Además de su efecto cardiotónico.

La posición de la camilla inclinada en ángulo de 45° en relación al suelo y con la cabeza del animal hacia abajo permitió que las vísceras abdominales se desplazaran cranealmente facilitando una rápida visualización del útero y ovarios. Uno de los problemas que se presentó es la condensación que se produce en el extremo del laparoscopio por diferencias de temperaturas entre el laparoscopio y la temperatura interna del animal. Otro problema es la sangre que cubre la punta del laparoscopio, producto de pequeñas hemorragias producidas a la perforación, impidiendo la observación. Ambos imprevistos se solucionaron retirando el laparoscopio de la cavidad abdominal y limpiándolo con una solución salina tibia. Este problema lo describió claramente Herrera (2000).

Mediante la técnica desarrollada en las ovejas del Grupo II se logró recolectar un 79,6 % promedio del total de medio infundido en los cuernos uterinos. Esta cantidad al compararse con la obtenida en promedio mediante la técnica laparoscópica utilizada en el Grupo I (70,2 %), es superior en 10 %, diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0,05$). Este resultado estaría indicando que la exposición del cuerno uterino para la recolección de embriones con ayuda del laparoscopio estaría bien fundada. Esta mayor cantidad de líquido

recuperado no se tradujo en un número mayor de embriones. Esto podría estar indicando que los embriones existentes en el cuerno salen en la primera fracción de líquido recuperado y que en el líquido residual obtenido por el masaje del cuerno, ya no habría más embriones.

Hubo ovejas en las que se realizó la recolección del medio sin ningún inconveniente, en otras hubo dificultades que se tradujeron en un porcentaje menor de recuperación de medio. Esto puede explicarse porque al perforar el cuerno uterino el estilete no haya llegado al lumen uterino y al colocar la sonda Foley esta se haya desplazado entre el endometrio y el miometrio. En esta situación el medio infunde entre ambos tejidos, en vez de fluir en la luz del cuerno. Este problema lo observamos al momento de retirar el medio de lavado del cuerno, medio que en su mayor parte no se pudo recuperar. Este problema se identificó al suceder una vez (un cuerno) con el método en que se exterioriza el cuerno. La identificación de este problema explicaría el hecho de que en dos cuernos uterinos lavados por laparoscopias se infundió una cantidad de líquido determinada y se recupero sólo una pequeña cantidad. Asociado a lo anterior, de estos cuernos no se recuperó ova. Por lo señalado anteriormente se debe procurar perforar el cuerno uterino con el estilete en posición perpendicular a su curvatura mayor (detalles de medios recolectado por oveja se observan en el Anexo 6).

Al momento de comparar ambas técnicas de recolección de embriones, se deben analizar los siguientes puntos:

- **Facilidad del método:** La técnica laparoscópica usada en el Grupo I requiere de personal adiestrado en la manipulación del útero a través del fórceps para lograr una adecuada exposición de cuerno para la perforación e introducción de la sonda Foley. Todo esto desde el exterior y visualizado solo a través del laparoscopio. La técnica laparoscópica usada en el Grupo II facilita en gran medida el lavado uterino, ya que a través del laparoscopio se ubica el cuerno y se toma con la pinza para llevarlo al exterior, donde la sujeción, perforación y colocación de la sonda en el cuerno se realiza directamente con las manos.
- **Tiempo empleado:** En un sistema de alta producción la variable tiempo es importante de considerar al momento de elegir una biotecnología. Mientras menos tiempo demore su realización, mayor cantidad de ovejas se someten a recolección de embriones en una jornada así, como también se utilizará menor cantidad de anestesia. Esto se traduce en mayor cantidad de embriones por jornada. El tiempo empleado en la técnica laparoscópica usada en el Grupo I fue aproximadamente 10 minutos menor. Estos resultados arrojaron diferencias significativas, que se traduce que al momento de evaluar ambas técnicas en este parámetro, la laparoscopia usada en el Grupo I está sobre la técnica modificada. Cabe señalar que a medida que más se practique recolecciones con una u otra técnica se adquiere más destreza y disminuye el tiempo empleado. En este trabajo disminuyó el

tiempo empleado a medida que se adquirió mas destreza tanto para la técnica del Grupo I como para la técnica de Grupo II. Se pudo observar en este trabajo, que lo que prolongó el tiempo de realización de la laparoscopia modificada fue el hecho de suturar dos planos de tejidos. Con respecto al tiempo empleado por otros autores en efectuar la técnica laparoscópica convencional no se reporta de este resultado en los trabajos revisados. Vivanco (2000) señala que el tiempo empleado por su equipo de trabajo en realizar esta técnica fluctúa entre 8 a 10 minutos. Baril y col. (1995), señalan un tiempo empleado de 20 a 30 minutos por hembra utilizando laparoscopia, señalando además que un equipo formado por tres personas puede llevar a cabo 10 a 12 recolecciones por día. Este trabajo se aproximaría mas al tiempo señalado por estos últimos autores.

- Eficiencia de recolección: Otro factor a considerar es la eficiencia de recolección de ova. Ambos métodos arrojaron resultados semejantes y estadísticamente sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.4. RECOLECCIÓN DE OVA.

No hubo diferencia en el total de ova recolectado por grupo. Se obtuvo un promedio total de ova por oveja de $3,6 \pm 0,4$ en un rango de 0 – 11. Los promedios de ova recolectados por oveja obtenidos para el Grupo I de $3,3 \pm 2,4$ (rango 0 – 8) y para el Grupo II fue de $3,8 \pm 3,9$ (rango 0 – 11). Ambos promedios son inferiores a los obtenidos por Folch y col. (1997) de 5,2 embriones por oveja y estarían dentro de los promedios obtenidos por Letelier (1997), de $2,3 \pm 2,3$ y $4,1 \pm 2,7$ quien superovuló con distinto tratamientos hormonales.

La eficiencia de recolección o porcentaje de recuperación de ova fueron similares para ambos grupos. Nellenschulte y col (1991) utilizaron laparoscopia y el porcentaje de recuperación de ova que obtuvieron mediante 2 lavados fue superior. Vivanco (2000) señala obtener un porcentaje de recuperación de ova que va de un 54,8 % a un 76,3 % utilizando laparoscopia. Ambos resultados superan a los obtenidos en este trabajo. Posiblemente, esto se deba al alto dominio que han desarrollado estos autores sobre esta técnica. Los resultados obtenidos para el Grupo II se alejan mucho de los obtenidos por Scudamore y col. (1991), Devinzenci y col. (1997) y Folch y col. (1997), quienes obtuvieron un 72,6 %, 75,4 % y 80,4 % de eficiencia de recolección por medio de una laparotomía y utilizando sonda Foley respectivamente. Davis y Correa (1984), Bonino y col. (1989), Rubianes y col. (1995) y Letelier (1997) publicaron resultados del 63 %, 70 %, 90 % y (42,3 % y 26,6 %) respectivamente, promedios que no son comparables debido a que esos autores utilizaron otros métodos de lavado. A pesar de obtener mediante estos métodos alto porcentaje de recolección de ova, no son recomendados por el alto grado de adherencias que producen las que limitan sucesivas recolecciones.

6.5. EVALUACIÓN DE LOS OVA.

Debido a que se logró 100 % de fecundación en los ova recolectados, se deduce que el manejo de los servicios y el tratamiento superovulatorio utilizados fueron los indicados. Para asegurarnos de obtener el máximo de fecundación, el carnero se colocó en el corral de las ovejas cada 12 horas, lográndose un promedio de 7,8 servicios por oveja. Este número de servicios puede considerarse alto pero fue muy eficiente.

Referente a los estados de los ova recolectados, se observó que los porcentajes de los diferentes estadios de desarrollo recuperados (Cuadro 5) se asemejan bastante a los obtenidos por Boggio (2002) que realizó la recolección de embriones entre los días 6 y 7 postservicio. El recolectó 8,2 % de mórulas, 22,8 % de mórulas compactas, 9,2 % de blastocistos, 14,8 % de blastocistos expandidos y 4,1 % de blastocistos eclosionando en su gran mayoría. En este trabajo se recolectó en gran mayoría mórulas compactas 25,4 %, blastocistos expandidos 38,1 % y blastocistos eclosionados 31,7 %. Letelier (1997) recolectó en su gran mayoría mórulas, mórulas compactas y blastocistos. Davis y Correa (1984) al día 7 del servicio recolectaron solo blastocistos.

Con respecto a la calidad embrionaria esta puede considerarse como muy buena ya que el 60,3 % de los embriones clasificó grado 1, un 22,2 % grado 2, el 9,5 % grado 3 y 7,8 % grado 4. Por lo que se obtuvo un total del 82,5 % de embriones de excelente y buena calidad.

Finalmente, en este estudio, puede considerarse que la técnica propuesta como una alternativa a la recolección de embriones por laparoscopia en ovejas, no se sustenta completamente dado los resultados obtenidos donde si bien la cantidad de medio de lavado recuperado fue mayor, se recolectó una cantidad similar de embriones y el tiempo empleado en la ejecución de la técnica fue mayor.

De lo anteriormente discutido se puede deducir que es necesario realizar investigaciones adicionales para el desarrollo de técnicas de recolección de embriones más eficientes con el fin de obtener embriones transferibles y de buena viabilidad. Se propone por ejemplo variar esta técnica de manera a realizar una pequeña incisión en la pared abdominal, de no más de 2 cm con el fin de acercar el cuerno uterino para ser lavado sin exteriorizarlo de la cavidad abdominal, así se manipularía en menor grado el cuerno, para evitar adherencias. También se propone evaluar las adherencias que pueden provocarse con ambos métodos descritos en este trabajo.

7. CONCLUSIONES.

Se desarrolló y evaluó una técnica de recolección de embriones asistida por laparoscopia que permitió:

- la colocación de la sonda Foley con mayor facilidad en el cuerno uterino.
- recuperar mayor cantidad de medio infundido en los cuernos uterinos.
- recuperar similar cantidad de embriones a los obtenidos mediante la técnica laparoscópica.
- recolectar embriones en mayor tiempo al utilizado por la técnica laparoscópica.

8. BIBLIOGRAFÍA.

ARAYA, J. C. 1995. Inducción de superovulación en murinos, ovinos y bovinos utilizando un extracto hipofisiario equino (HAP). Tesis de Magíster en Ciencias Mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

BALDASSARRE, H. 1995. Avances en reproducción asistida en ovinos. Anais del XI Congreso Brasileiro de Reproducao Animal. Foz de Iguazú, Brasil. 156 - 168.

BARI, F.; M. KHALID; B. WOLF; W. HARESING; A. MURRAY; B. MERRELL. 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*. 56: 147 - 155.

BARIL, G.; P. BREVION; P. CHESNÉ. 1995. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

BOGGIO, J. C. 1997. Sobrevivencia *in vitro* de embriones ovinos congelados convencionalmente preparados para transferencia directa en 1,5 M etilenglicol. Primer comunicación en Uruguay. Producción Ovina. Secretariado Uruguayo de la Lana. Uruguay. 10: 63 - 74.

BOGGIO, J. C. 2002. Vitricación y congelación convencional de embriones ovinos. Comparación de ambos métodos según sobrevivencia y desarrollo *in vitro*. Tesis de Magister en Ciencias Mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

BOLAND, M. P.; I. GORDON. 1982. Effect of repeated horse anterior pituitary extract treatment on ovulatory response in the ewe. *Vet. Rec.* 111: 391 - 392.

BONINO M.; P. HUGHES; A. VILLAAMI; M. AZZARINI; F. VALLEDOR. 1989. Multiovulación y trasplante embrionario en ovinos. Resumen de experiencias realizadas en el Uruguay. Producción Ovina. Secretariado Uruguayo de la Lana. Uruguay. 1: 11 - 22.

CABODEVILA, J. 2000. Superovulación de hembras bovinas. En: Biotecnología de la reproducción. Editado por: Palma, G. A. 2001.

CAVESTANY, D.; P. HUGHES; R. CASH; A. DURÁN. 1979. Consideraciones sobre experiencias de trasplante en embriones en ovinos realizadas en Uruguay. 1^{as}. Jornadas Veterinarias de Ovinos. Montevideo, Uruguay. 1 - 5.

CELESTINOS, M. 2003. Evaluación de la sobrevivencia *in vitro* de embriones de coneja bipartidos antes y después de la vitrificación. Tesis de Magister en Ciencias Mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

CHILE, 2002. Ministerio de Agricultura, FIA. Proyecto “Desarrollo e implementación de transferencia de embriones y producción *in vitro* de embriones mediante laparoscopia en ovinos”. FIA BIOT 01 – P – 063. Chile.

CORREA, J. E. 1972. Primer nacimiento de un cordero en Chile logrado por trasplante de óvulos. Arch. Med. Vet. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 4: 1 - 4.

CUETO, M., A. GIBBONS, R. GONZALEZ. 1992. Grupo de Reproducción y Genética. (Ed.). Curso de Entrenamiento en Congelamiento de Semen, Inseminación Artificial Intrauterina y Transferencia de Embriones en Ovinos. Inst. Nac. de Tec. Agrop. (INTA), Est. Exp. Agrop. San Carlos de Bariloche, Depto. de Prod. Animal; Grupo de Reproducción y Genética. Bariloche, Río Negro, Argentina. pp 57.

DAVIS, I. C.; J. E. CORREA. 1984. Inducción de superovulación y transferencia de embriones en oveja. Agro Sur. 12: 6-10.

DEVINCENZI, J. C.; R. GATICA; J. CORREA. 1995. Efecto de la reutilización de un dispositivo vaginal con progesterona sobre la sincronización de celo e inducción de superovulación en ovejas. XX Reunión anual, Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA). Coquimbo, Chile.

DEVINCENZI, J. C.; R. GATICA; J. CORREA. 1997. Comparación de dos métodos de recuperación de embriones en oveja. XXII Reunión anual, Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA). Coquimbo, Chile.

EPPLESTON, J.; R. BILTON; N. MOORE. 1984. Effects of FSH dose and treatment regime on ovulatory response in sheep. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 16: 68.

EVANS, G.; D. T. ARMSTRONG. 1984. Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination. In: Reproduction in Sheep. Cambridge University Press. 165 - 180.

FOLCH, J.; B. AGUILAR; J. ALABART; M. COCERO; J. OLIVERA. 1997. La transferencia de embriones aplicada a la selección de la oveja rasa aragonesa. Información Técnica Económica Agraria (ITEA), Producción Animal. 18: 514-516.

FUKUI, Y.; M. FUJJI; Y. TASHIRO. 1993. Insemination doses of frozen – thawed semen in seasonally anoestrus ewes treated with two different progesterone – impregnated intravaginal devices. J. Repr. Dev. 39: 269 - 273.

GORDON, I. 1997. Reproduction in Sheep and Goats. Controlled reproduction in farm animals series. Vol. 2. CABI Publishing. Cambridge.

HAFEZ, E. S. E. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6^a ed. Editorial Interamericana.

HERRERA, I. 2000. Efecto del tratamiento repetido con FSH + eCG en la respuesta ovárica y aspiración folicular vía laparoscópica en terneras prepúberes. Valdivia, Chile. Tesis M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

HILLIER, S.D.; R. NAHUM; F. MIRO; C.D. SMYTH; M. TESTSUKA. 1996. Superovulation in women. Serono Symposium, in Loganath Annamalai (ed), Proceedings of the Australian - Society for Reproductive Biology. Singapore J Obs. Gyn. 27(1): 3-8.

KANAGAWA, H.; I. SHIMOHIRA; N. SAITOH. 1995. Manual of Bovine Embryo Transfer. Japan Livestock Technology Asociation, Japon.

LETELIER, C. 1997. Efectos del origen de la FSH en la inducción de superovulación en ovejas. Valdivia, Chile. Tesis M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

LINDER, G. M.; R. W. WRIGHT. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation, Theriogenology 20: 407 - 416.

LUCY, M. C.; J. D. SAVIO, L. BADINGA; R. L. DE LA SOTA; W. W. THATCHER. 1992. Factor that affect ovarian follicular dynamics in cattle. J. Anim. Sci. 70: 3615 – 3626.

MAXWELL, W. M.; A. SZELL; J. R. HUNTON; J. P. RYAN. 1990. Artificial breeding: Embryo transfer and cloning. In: Reproductive physiology of Merino sheep, concepts and consequences, Edit by: OLDHAM, C. M.; G. B., MARTIN; I. W., PURVIS. The University of Western Australia. Perth, Australia.

MOORE, N. W.; J. N. SHELTON. 1964. Response of the ewe to a horse anterior pituitary extract. J. Reprod. Sci. 7: 79 - 87.

MURPHY, B. D.; R. MAPLETOFT; W. HUMPHREY. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology 21: 117 - 125.

NELLENSCHULTE, E.; H. NIEMANN. 1991. Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy, Anim. Repr. Sci. 27: 293 - 304.

PAVEZ, C. H.; J. E., CORREA. 1988. Estudio laparoscópico seriado del aparato reproductivo de la oveja a través del ciclo estral y gestación temprana. Arch. Med. Vet. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 1: 64 - 68.

ROBERTSON, H. 1997. La reproducción en las ovejas y en las cabras. En Reproducción de los animales domésticos. Editado por COLE, H., P. CUPPS., 1997. 3^{ra} ed. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.

ROBINSON, T. J. 1951. The control of fertility in sheep. II. The augmentation of fertility by gonadotrophin treatment of the ewe in the normal breeding season. *J. Agric. Sci.* 41: 6 - 63.

RUBIANES, E.; T. CASTRO; C. VIÑOLES; R. UNGERFELD; B. CARVAJAL; S. KMAID. 1995. Superovulación y transferencia de embriones en ovinos. Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.

RUBIANES, E.; R. UNGERFELD; A. MENCHACA. 2002. Sincronización de celos en ovinos: Bases fisiológicas y distintas técnicas de manejo hormonal. X Congreso Latinoamericano de Buiatria. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatria. Paysandú, Uruguay. 17 - 122.

SCUDAMORE C. L.; J. J. ROBINSON; R. P. AITKEN. 1991. The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with or without sedation, on the recovery of embryos, their stage of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenology.* 35: 907 - 914.

SHELTON, J. N.; N. W. MOORE. 1967. The response of the ewe to pregnant mare serum and to horse anterior pituitary extract. *J. Reprod. Fertil.* 14: 175 - 177.

VIVANCO, W. 2000. Transferencia de embriones en las especies ovina y caprina. En: Biotecnología de la reproducción. Editado por: Palma, G. A. 2001.

WILMUT, I. 1987. Embryo transfer. In: *New Techniques in Sheep Production.* Editado por: Favez, I.; M., Marai; J. B., Owen. Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. 1987.

WRIGHT, R. W.; K. BONDIOLI; J. GRAMMER. 1981. FSH or FSH plus LH superovulation in ewes following estrous synchronization with medroxyprogesterone acetate pessaries. *J. Anim. Sci.* 52: 115 - 117.

Anexo 2: Duración del estro y características de la cubierta en ovejas superovuladas con gonadotrofinas.

	Oveja arete	Estro*			Momentos distintos de cubierta	Total servicios durante el celo
		Horas inicio**	Horas termino***	Duración total en horas		
G R U P O I	04	12	84	72	6	7
	07	12	48	36	4	5
	09	12	60	48	5	7
	14	24	84	60	5	6
	20	12	48	36	4	8
	22	0	84	84	6	6
	25	36	72	36	4	15
	39	12	60	48	3	4
	40	12	60	48	5	11
	43	24	72	48	5	11
PROMEDIO Gpo. I		15,6	67,2	51,6	4,7	8,0
D.E.		9,9	14,1	16,0	0,9	3,4
G R U P O II	01	24	72	48	5	14
	12	24	60	36	4	6
	17	0	36	36	4	8
	24	0	36	36	4	9
	28	36	72	36	4	12
	49	24	36	12	2	4
	30	24	48	24	3	5
	32	24	60	36	4	5
	34	24	60	36	4	6
	55	24	60	36	4	6
PROMEDIO Gpo.II		20,4	54,0	33,6	3,8	7,5
D.E.		11,4	14,1	9,5	0,8	3,3
	Prom.	18,0	60,6	42,6	4,3	7,8
	DE	10,7	15,3	16,7	1,0	3,2

* : controlado cada 12 horas desde el retiro del CIDR.

** : vista por primera vez en celo, horas transcurridas desde el retiro del CIDR.

*** : vista por última vez en celo.

Anexo 3: Ficha para cirugía.**Ficha Laparoscopia**

Fecha: _____

N° Arete:

Dr.(a): _____

Procedimiento

Preanestesia: _____

Hora:

Anestesia: _____

Hora:

Laparoscopia tradic./ modificada.

Hora inicio:

Hora término:

OVARIOS

Izquierdo

Derecho

Folículos > 3 < 9 mm: _____

Folículos >10 mm: _____

N° de CL: _____

Lavado Uterino:

CUERNOS

Izquierdo

Derecho

1°: Liq. Infundido: _____ Recuperado: _____

1°: Liq. Infundido: _____ Recuperado: _____

2°: Liq. Infundido: _____ Recuperado: _____

2°: Liq. Infundido: _____ Recuperado: _____

3°: Liq. Infundido: _____ Recuperado: _____

3°: Liq. Infundido: _____ Recuperado: _____

OBSERVACIONES:

TTO: _____

Anexo 5: Clasificación de ova recolectada según estadio de desarrollo y grado de calidad.

Grados	GRUPO I					GRUPO II					TOTAL FINAL
	1	2	3	4	TOTAL	1	2	3	4	TOTAL	
Mórula	1	0	0	0	1	2	0	0	0	2	3
Mórula compacta	4	1	0	2	7	5	3	0	1	9	16
Blastocisto expandido	10	3	1	0	14	5	3	2	0	10	24
Blastocisto eclosionado	6	2	2	1	11	5	2	1	1	9	20
No fecundado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin zona pelucida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zona pelucida vacia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	21	6	3	3	33	17	8	3	2	30	63

Anexo 6: Ficha resumen de recolección de embriones.

	N° oveja	Cuerno/ovario	Cuerpos luteos	Folic. >9mm	½ infundido ml		½ recuperado ml		Ova recolectada por cuerno	Ova recolectada Total	Eficiencia recolección	Tiempo empleado en la técnica min
					1 lav	2 lav	1 lav	2 lav				
G R U P O I	04	Izq.	7	1	10	10	8	12	1	5	29,4	20
		Der.	10	0	15	16	1,5	7	4			
	07	Izq.	1	0	15	15	1	3	0	0	0	25
		Der.	2	0	15	12	8,5	5	0			
	09	Izq.	4	0	10	10	9,5	9	2	2	33,3	15
		Der.	2	0	10	10	9,5	8	0			
	14	Izq.	2	1	8	5	3	6	1	4	80	14
		Der.	3	0	10	10	7	4	3			
	20	Izq.	4	0	18	19	15	16	2	4	57,1	25
		Der.	3	0	10	11	8	6	2			
	22	Izq.	1	0	10	10	8	8	1	3	60	27
		Der.	4	0	9	10	8	9	2			
	25	Izq.	4	0	13	13	13	14	4	8	88,8	20
		Der.	5	0	13	12	12	6	4			
	39	Izq.	3	1	10	10	9,5	9	2	4	80	16
		Der.	2	0	8,5	9,5	8	9,5	2			
	40	Izq.	2	0	16	20	11	10	1	3	50	20
		Der.	4	1	20	15	16	9	2			
43	Izq.	2	0	13	5	5	5	0	0	0	28	
	Der.	3	1	14	15	12	12	0				
TOTAL Gpo. I			68	5	247,5	237,5	173,5	167,5	33	33	48,5	21
G R U P O II	01	Izq.	1	1	15	15	12,5	16	0	3	33,3	35
		Der.	8	0	20	20	10	11	3			
	12*	Izq.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	12
		Der.	0	0	0	0	0	0	0			
	17	Izq.	2	1	12,5	10	8,5	6	0	0	0	48
		Der.	1	1	11	13	11	10	0			
	24	Izq.	2	0	8	10	7	4,4	1	1	20	35
		Der.	3	1	10	10	9	10,5	0			
	28*	Izq.	0	Quistes	0	0	0	0	0	0	0	21
		Der.	1	0	0	0	0	0	0			
	30	Izq.	4	0	10	10	9	10	4	7	87,5	20
		Der.	4	0	11,5	11	9,5	12	3			
	32	Izq.	7	0	12	10	9,5	9	0	1	6,6	27
		Der.	8	0	9	8	7,5	3,5	1			
	34	Izq.	4	0	11	8	9	8	0	1	14,2	25
		Der.	3	0	10	8	6,5	11	1			
	49	Izq.	5	0	12	13	12	13	5	11	100	33
		Der.	6	0	10	12	9,5	12	6			
55	Izq.	6	0	10	10	7	10	6	6	85,7	27	
	Der.	1	0	10	10	3	1	0				
TOTAL Gpo. II			67	5	182	178	140,5	147,4	30	30	47,6	31
TOTAL Gpo I y II			135	10	/	/	/	/	63	63	48,1	/

* Ovejas eliminadas del trabajo experimental.

AGRADECIMIENTOS.

Sinceramente agradezco al proyecto FIA, Biot-01-p-063, “Desarrollo e implementación de transferencia de embriones y producción *in vitro* de embriones mediante laparoscopia en rumiantes menores”, por permitirme la realización de esta memoria de título dentro del marco de éste.

Los más sinceros agradecimientos a:

Dr. Jorge Correa por abrirme las puertas de este instituto, por su valiosa guía y colaboración en este trabajo.

Dra. Danai Bücher por su gran apoyo incondicional, constante colaboración y amistad.

Sra. Carmen Schüller por su gentil colaboración en la práctica de este trabajo, pero especialmente por su gran cariño de madre.

Rubén y Sergio por su cooperación y disposición en la realización de la parte práctica de esta memoria.

Amigos de Magister en Reproducción, por su comprensión, apoyo, colaboración y valiosa amistad.

ClauLete, Hedi, Dr. Martinez, Pedro Pablo, Gastón, Marcos, Guille, Luchito, Ruby y Jimmy por su invaluable ayuda.

Padres y hermanos por su paciencia, comprensión y gran apoyo.

Gringa y Danai por abrirme las puertas de sus casas.

A mis grandes amigas; Gringa, Gigi, Amparo y Vicky por estar siempre a mí lado.

Amigos de MSN por su constante compañía esas noches tan largas...

Gracias a todos ellos, y a quienes no alcanzo a mencionar, que de una u otra forma prestaron su apoyo incondicional e hicieron posible este trabajo.