

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

**EFECTO DE LA eCG EN LA RECUPERACIÓN DE COCs MEDIANTE PUNCIÓN  
FOLICULAR GUIADA POR LAPAROSCOPIA EN OVEJAS**

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

**JAVIER ALEJANDRO ESCOBAR PARDO**

**VALDIVIA-CHILE**

**2007**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. Jorge E. Correa S.

---

Nombre

Firma

**PROFESORES CALIFICADORES**

Dr. Marcelo Hervé A.

---

Nombre

Firma

Dr. Marcelo Gómez J.

---

Nombre

Firma

**FECHA DE APROBACIÓN:**

26 de Noviembre del 2007

*Con cariño a mis padres y hermanos.*

## ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSIÓN.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25
8. ANEXOS.....	29
9. AGRADECIMIENTOS.....	31

## 1. RESUMEN

El propósito de esta tesis fue implementar la técnica de aspiración folicular por medio de laparoscopia y estudiar el efecto de la eCG sobre el número de folículos y calidad de los complejos cúmulo-ovocito (COCs) recuperados.

Se utilizaron doce ovejas de la raza Corriedale asignadas a dos grupos de seis animales (grupos I y II). Todas las ovejas fueron sincronizadas durante doce días con dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR®).

En el Grupo I, al retiro de los dispositivos, las ovejas fueron tratadas con una inyección única de eCG (800 UI) mientras que el grupo II fue considerado control (solución salina). A las 24 horas de retirados los CIDR, se procedió a realizar la aspiración de los folículos mayores a 2 mm separando los folículos en menores y mayores a 5 mm.

En el Grupo I se puncionó un total de 82 folículos, siendo  $13,6 \pm 1,2$  el número de folículos aspirados por ovejas. Para el Grupo II se puncionaron un total de 54 folículos, siendo  $9 \pm 2,1$  el número de folículos aspirados por oveja, encontrándose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre ambos grupos.

Hubo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el número de folículos puncionados menores a 5 mm entre ambos grupos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para las categorías de folículos mayores a 5 mm.

Los COCs recolectados fueron observados al microscopio y clasificados a tres categorías de acuerdo a su morfología y calidad, encontrando un 20,7 % de COCs categoría A (totalmente rodeados por células del cúmulo), 43,1 % B (parcialmente rodeados por células del cúmulo) y un 36,2 % de los COC's se encontraban desnudos.

De esta manera la aspiración folicular a través de laparoscopia quedó establecida. El tratamiento con eCG aumentó el número de folículos puncionables en la categoría de folículos menores a 5 mm de diámetro y no influyó en el número de folículos mayores de 5 mm.

**Palabras claves:** ovejas, laparoscopia, aspiración folicular, COCs, eCG.

## 2. SUMMARY

### **EFFECT OF eCG ON COCs RECOVERY BY FOLLICULAR PUNCTION THROUGH LAPAROSCOPY IN SHEEP**

The aim of this thesis was to set up the follicular punction through laparoscopy and to study the effect of eCG on the number of follicles and cumulus oocyte complex (COCs) recovered.

Twelve Corriedale ewes were assigned to two groups of six animals (groups I y II). All the ewes were synchronised for 12 days with intravaginal devices of progesterone (CIDR®).

In Group I the ewes were treated with a single injection of eCG (800 UI) at the withdrawl of the devices, ewes of the group II were considered as control and were injected with saline. Laparoscopies were carried out 24 hours after CIDR withdrawl and all follicles biggest than to 2 mm were punctioned, classifying them in smaller and bigger to 5 mm.

Eighty two follicles in Group I ( $13.6 \pm 1.2$  per ewe) and 54 follicles in Group II ( $9 \pm 2.1$  per ewe) were punctioned respectively; this ovarian answer was significant different ( $P < 0.05$ )

There were significant differences ( $P < 0.05$ ) for the categories of follicles smaller than to 5 mm but no for follicles greater to 5 mm.

The COCs collected were observed under stereomicroscope at 20-40X and were classified to 3 categories according to morphology and quality. Twenty point seven of COCs of class A (fully surrounded by cells of the cumulus), 43.1 % B (partially surrounded by cells of the cumulus and 36.2 % de los COCs of class C (naked) were recovered.

It is possible to conclude that the follicular punction through laparoscopy was set up in sheep. The eCG treatment increased the number of follicles smaller than 5 mm of diameter.

**Key words:** sheep, laparoscopy, follicular aspiration, COCs, eCG.

### 3. INTRODUCCIÓN

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 (Gordón 1997).

En la especie ovina, el proceso de foliculogénesis o de crecimiento y desarrollo de folículos ováricos desde el estadio de folículo primordial a folículo preovulatorio ha sido objeto de numerosos estudios y revisiones bibliográficas (Driancourt 1991, Mariana y col 1991).

En pequeños rumiantes como en otras especies, las técnicas de reproducción asistida como lo es la superovulación, punción folicular, conservación y transferencia de embriones (TE), constituyen en la actualidad una herramienta imprescindible tanto para el desarrollo de programas de conservación de recursos genéticos, como para la aplicación de programas de mejora genética destinados a incrementar las producciones ganaderas (López 2004).

Las técnicas de obtención de ovocitos en ovejas 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 por sacrificio de la donante.

La mayor demanda de ovocitos para ser utilizados en la producción de embriones incentivó a desarrollar la técnica de recuperación de ovocitos en donantes vivas por medio de laparoscopia. La técnica presenta una amplia variación en sus resultados debido a que está supeditada a aspectos instrumentales y metodológicos. Su utilidad se basa en que se conoce el nivel sanitario del animal donante, a diferencia de los ovocitos obtenidos de ovarios de matadero, y asimismo se posibilita la realización de tratamientos hormonales para mejorar la cantidad y calidad ovocitaria.

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 de un cordero en Chile mediante este método (Correa 1972). Además, utilizaron laparoscopia por primera vez para el estudio de los ovarios durante el ciclo estral de ovejas (Pavez y Correa 1988).

### 3.1 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 –  $PGF2\alpha$  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).

### 3.2 SINCRONIZACIÓN DE CELO

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).

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. Los métodos naturales, aunque son de muy bajo costo, 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).



### 3.3 MÉTODOS DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atresicos. Esto, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimientos *in vitro* (Gordon y Lu 1990).

En 1986, Roberts describió por primera vez la técnica laparoscópica en ovejas. Desde entonces, ha adquirido una creciente importancia, especialmente en la aplicación de biotecnologías reproductivas en esta especie.

Las técnicas de laparoscopia y laparotomía utilizadas para recuperar ovocitos son invasivas, aunque el empleo de laparoscopia es menos perjudicial para la hembra donante, lo cual hace que sea repetible. Estas técnicas se pueden emplear en especies pequeñas y en edades donde no es fácil realizar la manipulación del tracto reproductivo por vía rectal durante la recuperación de ovocitos y/o transferencia de embriones. Además, requieren sujetar a la hembra en posición cubito dorsal, anestesarlas y realizar la aspiración de los contenidos foliculares (Galli y col 2001).

La punción folicular puede ocasionar alteraciones morfológicas y funcionales del ovario, cuyo efecto está proporcionalmente relacionado con el número de sesiones de punción y el número medio de estructuras recuperadas por sesión de colección (Viana y col 2003).

### 3.4 ASPIRACIÓN LAPAROSCÓPICA

El desarrollo de biotecnologías como inseminación artificial, transferencia de embriones y fecundación *in vitro* han tenido un desarrollo importante en bovinos y equinos. No así en rumiantes menores, ya que la anatomía del tracto reproductivo en estas especies hace imposible la penetración cervical para la recuperación de embriones y ovocitos, así como la introducción de semen para inseminación artificial.

Es así como en un principio se recurría al sacrificio de los animales para la observación del aparato reproductivo y estudios preliminares de técnicas reproductivas.

Los primeros trabajos apuntaron a la inseminación y posterior recuperación quirúrgica de embriones, reportándose índices bajos de recuperación que fluctuaron entre 13% y 30% (Jainudeen y col 1966, Onuma y col 1970, Seidel y col 1971, Sciarresi 1984).

Con el desarrollo de técnicas de maduración de ovocitos y *Fecundación in Vitro* (FIV) el siguiente paso fue extraer los ovocitos mediante aspiración folicular desde animales vivos, utilizándose laparotomía en primera instancia con resultados poco alentadores por tratarse de una técnica muy invasiva y poco repetible (Silva 1988). Esta técnica se utilizó para la observación de los ovarios en 1961 por Lamond y Urguhart, sin embargo, provocaba adherencias que interferían con la posterior fertilidad de los animales.

Luego, se desarrolló la técnica de aspiración folicular mediante laparoscopia (Armstrong y col 1991, Herrera 2000), la cual resultó ser menos traumática que la laparotomía en las donantes. Holland y col (1981) y Lambert y col (1983), evaluaron la técnica laparoscópica en bovinos, lo que dio como resultado altas tasas de recuperación. Sin embargo, a pesar de que la técnica laparoscópica tiene un alto grado de repetibilidad, posee la desventaja de ser una técnica invasiva y laboriosa, pudiendo formar adherencias en el sitio de punción.

### **3.5 ESTIMULACIÓN GONODOTRÓFICA EN OVEJAS**

Las hormonas utilizadas para inducir ovulación (liberación de un ovocito o formación de cuerpo lúteo) o superovulación (desarrollo y ovulación de un número de folículos mayor a lo normal (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 ovejas son la Hormona Folículo Estimulante (FSH), Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG), Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH), Hormona Luteinizante (LH), Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG).

En el caso de la eCG, esta ha sido usualmente administrada como inyección única 24 horas antes o al tiempo de la última inyección o del retiro de la esponja de P4 (Gordon 1983, Davis y Correa 1984, Correa y Vandeputte 1986).

#### **3.5.1 Gonadotrofina Coriónica Equina (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 gonadotrofinas disponibles en el comercio y se emplea para inducir la superovulación (Hafez 1996).

La eCG a diferencia de la FSH requiere de una sola aplicación, debido a su larga vida media, siendo aproximadamente de unas 26 hrs (Mc Donald 1981).

En la yegua, la eCG se forma en los folículos accesorios, que persisten hasta el día 180 de preñez, aproximadamente. En otros animales hembras, la eCG estimula el crecimiento folicular y la formación de las células intersticiales del ovario y provoca la ovulación (Smidt 1972).

La eCG es quizás la gonadotropina más utilizada, por ser fácil de obtener y poseer una vida media y estabilidad mayor que otras gonadotropinas (LH y FSH). A pesar de los buenos resultados que ha demostrado tener, se ha observado una notable incidencia de folículos persistentes a altas dosis.

### **3.6 HIPÓTESIS**

La administración de eCG aumenta la recuperación de COCs por laparoscopia en el ovino.

### **3.7 OBJETIVOS**

#### **3.7.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto de la eCG sobre el crecimiento folicular y recuperación de COCs.

#### **3.7.2 Objetivos específicos**

Desarrollar la técnica de punción folicular a través de laparoscopia y obtener ovocitos de hembras ovinas.

Evaluar la cantidad y calidad de ovocitos de ovejas tratadas con y sin tratamiento gonadotrófico.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó durante los meses de marzo a julio de 2007 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 12 ovejas de la raza Corrediale, seleccionadas al azar de un rebaño de 38 animales previamente individualizadas con un autocrotal numerado. Se registraron los números de cada una de las 12 ovejas seleccionadas. Las ovejas se mantuvieron estabuladas en el pabellón del IRA. Su alimentación consistió en 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)

#### 4.1.3 Material preoperatorio

- Rasuradora, jabón germicida, algodón, alcohol 70°, toalla de papel desechable.
- Jeringas de 1 y 5 ml.
- Acepromacina. (3)

---

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

2. FOLLIGON®. Laboratorio Intervet, Holanda.

3. PACIFOR®, Drag Pharma.

#### **4.1.4 Material para laparoscopia**

- Camilla operatoria de sujeción regulable.
- Bomba de aire.
- Fuente de luz fría de intensidad variable Storz.
- Cable de fibra óptica.
- Trocar de punta cónica para laparoscopia Storz 26020A de 11 mm.
- Trocar para Fórceps Storz 26172C de 5 mm.
- Laparoscopia Storz Hopkins 26030B,
- Fórceps de sujeción atraumático.
- Agujas de 21G (4)
- Sonda de Levin de 2,66 mm de diámetro (5)
- Pipeta de inseminación artificial
- Medio de recuperación: Dulbeco 1 % suero bovino.
- Germicida en spray. (6)
- Antibiótico larga acción, Oxitetraciclina. (7)

#### **4.1.5 Material para manipulación de ovocitos**

- Tubos Falcon 15 ml con tapa.
- Medio de mantención: Dulbeco 1 % suero bovino con heparina.
- Platina térmica a 38°C.
- Placas Petri de diferentes tamaños.
- Microscopio estereoscópico.
- Pipeta para manejar ovocitos.

---

4. BD ASEPTO®, Becton Dickinson Ind.

5. PENNINE®, sonda de alimentación pediátrica LT 2208

6. LARVISPRAY®, Laboratorio Pfizer, Chile.

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

## 4.2 MÉTODOS

Se asignaron al azar doce ovejas en 2 grupos.

Grupo I (n = 6). Con tratamiento gonadotrófico.

Grupo II (n = 6). Sin tratamiento gonadotrófico (solución salina).

### 4.2.1 Sincronización de estros

Se sincronizaron los estros de las 12 ovejas con dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR®) mantenidos por 12 días.

### 4.2.2 Esquema de crecimiento folicular múltiple y punción folicular

El tratamiento consistió en la administración única de 800 UI de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) (Folligon, Intervet, Holanda, lote: 28555), vía intramuscular, al momento de retirado los CIDR. A las 24 horas de retirados estos se puncionó folículos menores y mayores a 5 mm en forma separada, depositando el contenido aspirado en tubos Falcon individualizados y correctamente rotulados.

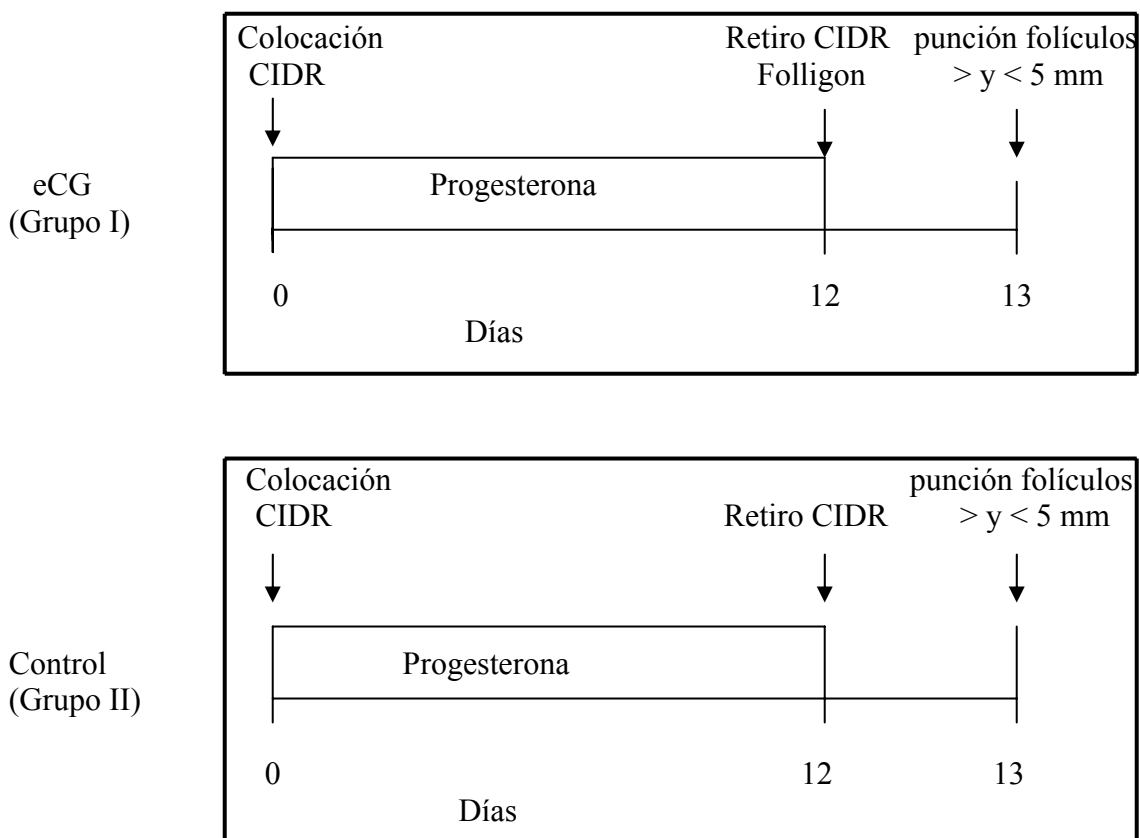


Figura 1. Esquema de tratamientos hormonales y punción folicular en ovejas.

### 4.2.3 Ensayo Pre-experimental

El estudio experimental de aspiración folicular mediante laparoscopia en ovinos, fue precedido por un periodo de ensayo, en el cual se trabajo durante tres meses, realizando intervenciones laparoscópicas dos veces por semanas, con el fin de aprender y perfeccionar la tecnica, para ser trabajada de forma exitosa con los animales destinados al trabajo experimental.

En este periodo destinado a ensayo, se logro reducir el tiempo de exposición de los animales, hacer más eficiente la recuperación de COCs y manejar en forma adecuada una dosis exacta del tranquilizante, así como a la vez una mejor utilización de los diversos instrumentos y materiales que componen un equipo de laparoscopia.

### 4.2.4 Técnica Laparoscópica

Las ovejas fueron sometidas a un ayuno de 24 horas previo a la punción, El tranquilizante elegido fue acepromacina (Pacifor®, Drag Pharma) en dosis de 0,2 mg/kg intramuscular.

Los animales se colocaron en posición decúbito dorsal, sobre una camilla reclinable (Davis y Correa 1984) y se procedió a su inmovilización. Se rasuro la región abdominal desde el apéndice del xifoides hasta la glándula mamaria y desde el pliegue del ijar derecho hasta el pliegue del ijar izquierdo, zona que fue lavada con jabón germicida y desinfectante con alcohol de 70° (Stockebrand 2003).

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

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 ventral. 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. Se indujo neumoperitoneo con aire comprimido conectando una bomba de aire a través de una sonda directamente al laparoscopio.

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 fórseps con el que se manipularon los ovarios. El ovario se tomó desde el mesovario, con el fin de dejar libre el oviducto, se observaron los ovarios y se evaluó la dinámica folicular.

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, menores de 5 mm diámetro y mayores de 5 mm, tomando como referencia el bisel de la aguja que es de 3 mm.

#### 4.2.5 Recuperación de ovocitos

Para la punción de los folículos se utilizaron agujas de 21G (BD Asepto®, Becton Dickinson Ind.) adosadas al extremo de una pipeta de inseminación artificial (para mantener la sonda rígida) que contiene en su interior una sonda de Levin de 2,66 mm de diámetro (Pennine®, sonda de alimentación pediátrica LT 2208) que desemboca en un tubo de 15 ml (Falcon), para introducir la aguja de punción se realizó una perforación con un trocar y un punzón de 6 mm de diámetro (Kartz Storz®, modelo 26172 C) en la línea media algunos cm craneal a las punciones mas laterales. El contenido folicular fue aspirado mediante una bomba de vacío regulada, que trabajó a una presión de 40 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 el medio de lavado fueron recolectados en tubos Falcon de 15 ml con tapa. Dependiendo del diámetro de los folículos (mayores o menores a 5 mm.), estos fueron aspirados en su tubo correspondiente.

El medio de recuperación utilizado fue Dulbecco 1% de suero fetal bovino, el cual se mantuvo en estufa a una temperatura de 30°, previa utilización. Para evitar la coagulación de la sangre aspirada se utilizo heparina (Heparina Sodica, Laboratorio Chile) en el medio de recuperación, en una concentración de 50 U.I/ml y así evitar los problemas de contaminación provocadas por la sangre. Los folículos aspirados junto al medio se depositaron en tubos con tapa, registrándose la cantidad recuperada. Los tubos se mantuvieron en una platina templada a 38°C hasta la llegada al laboratorio (Stockebrand 2003).

Luego de la laparoscopia las heridas producidas por los trocar fueron desinfectadas con Larvispray® (Pfizer) y cada oveja recibió una inyección de oxitetraciclina (Steclin LA max®, Novartis) en dosis de 20 mg/kg vía intramuscular. Al retirar los trocares se presionó la cavidad abdominal para ayudar a la salida del aire de su interior.



#### 4.2.6 Evaluación de los Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs)

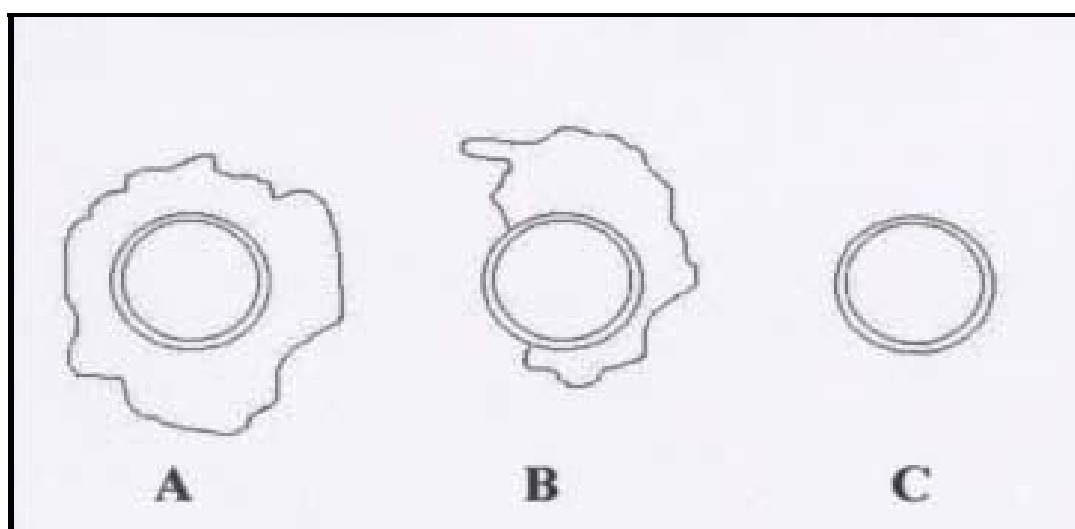
Finalizada la intervención, se llevó el medio recolectado y debidamente identificado a placas Petri. Estas fueron observadas en busca de los Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) mediante un microscopio estereoscópico 20X a 40X. Se registró la cantidad de ovocitos observados, estado de desarrollo y su calidad.

La calidad de los Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs), fue determinada al evaluar la integridad y grado de expansión del cúmulo, clasificándolos en las siguientes categorías (Herrera 2000).

Clase A: completamente rodeados por células del cúmulo.

Clase B: parcialmente rodeados por células del cúmulo.

Clase C: ovocitos desnudos.



(Herrera 2000)

Figura 2. Esquema de los Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) según la integridad de los Cúmulos, A: completamente rodeados por células, B: parcialmente rodeados por células y C: ovocito desnudo.

#### **4.2.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el uso de estadística descriptiva (números y porcentajes), y son presentados en tablas y gráficos.

Las diferencias significativas entre número de folículos puncionados, COCs recuperados, tasa de recuperación y categoría de COCs entre ambos grupos con y sin estimulación gonadotrófica previa fueron analizados mediante una prueba t de Student con un nivel de significancia del 5%.

## 5. RESULTADOS

Las laparoscopías se realizaron sin mayores complicaciones. Sin embargo hubo problemas con una oveja, la cual presentó regurgitación al encontrarse en la camilla reclinable, muriendo esta unidad experimental, siendo esta reemplazada por otra oveja.

Los resultados se muestran en las siguientes Tablas.

### 5.1 Colección y calidad de ovocitos

Se puncionó un total de 136 folículos, en 12 sesiones de OPU y 58 COCs (42,6%) fueron colectados. Los resultados por grupo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Número total y promedio ( $\pm$  d.e) de COCs recuperados y calidad de COCs, a partir de las aspiraciones foliculares realizadas en ambos grupos de ovejas

Características	G1 ( eCG ) n = 6	G2 (control) n = 6
Nº total de sesiones	6	6
Nº total de folículos puncionados	82 <sup>a</sup>	54 <sup>b</sup>
Nº total de COCs recuperados	35	23
Tasa de recuperación (%)	42,7	42,6
Nº de folículos aspirados / oveja	13,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	9 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
Nº de COCs recuperados / oveja	5,8 $\pm$ 1,8	3,8 $\pm$ 1,7
Nº de COCs (%) / categoría		
	A 9 (25,7)	3 (13)
	B 13 (37,1)	12 (52,2)
	C 13 (37,1)	8 (34,8)

a, b: Superíndices distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.1 Colección y calidad de ovocitos de folículos menores a 5 mm de diámetro

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las sesiones de aspiración folicular, correspondientes a las punciones realizadas a los folículos menores a 5 mm de diámetro, en ambos grupos de animales. Estos procedimientos se llevaron a cabo a las 24 horas de retirados los CIDR. Los resultados obtenidos en ambos grupos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Número total y promedio ( $\pm$ d.e) de COCs recuperados y calidad de COCs, a partir de las aspiraciones foliculares realizadas a folículos menores a 5 mm en ambos grupos de ovejas.

Características	G1 (eCG) folículos < 5mm	G2 (control) folículos < 5mm
Nº total de sesiones	6	6
Nº total de folículos puncionados	64 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>
Nº total de COCs recuperados	21	16
Tasa de recuperación (%)	32,8	36,3
Nº de folículos aspirados / oveja	10,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	7,3 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
Nº de COCs recuperados / oveja	3,5 $\pm$ 1,5	2,6 $\pm$ 1,6
Nº de COCs (%) / categoría		
	A 4 (19,0)	3 (18,8)
	B 7 (33,3)	7 (43,8)
	C 10 (47,6)	6 (37,5)

a, b: Superíndices distintos en la misma fila indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.2 Colección y calidad de ovocitos de folículos mayores a 5 mm de diámetro

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las sesiones de aspiración folicular, correspondientes a las punciones realizadas a los folículos mayores a 5 mm de diámetro, en ambos grupos de animales. Procedimientos que se llevaron a cabo a las 24 horas de retirados los CIDR. Los resultados obtenidos en ambos grupos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Número total y promedio ( $\pm$  d.e) de COCs recuperados y calidad de COCs, a partir de las aspiraciones foliculares realizadas a folículos mayores a 5 mm en ambos grupos de ovejas.

Características	G1 (eCG) folículos > 5mm	G2 (control) folículos > 5mm
Nº total de sesiones	6	6
Nº total de folículos puncionados	18	10
Nº total de COCs recuperados	14	7
Tasa de recuperación (%)	77,7	70
Nº de folículos aspirados / oveja	3 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 0,8
Nº de COCs recuperados / oveja	2,3 $\pm$ 1,2	1,16 $\pm$ 0,7
Nº de COCs (%) / categoría		
	A 5 (35,7)	0
	B 6 (42,8)	5 (71,4)
	C 3 (21,4)	2 (28,5)

No se encontró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

Con respecto a los Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs), y en relación con la integridad del cúmulo y sus características, estos presentaban el siguiente aspecto.



*Figura 3. Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) clase A, completamente rodeados por células del cúmulo, en ovejas (20 X).*



*Figura 4. Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) clase B, parcialmente rodeados por células del cúmulo, en ovejas (20 X).*



*Figura 5. Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) clase C, ovocito desnudo, en ovejas (20 X).*

Los porcentajes de Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) obtenidos según la integridad del cúmulo y tamaño de los folículos se exponen en los siguientes gráficos.

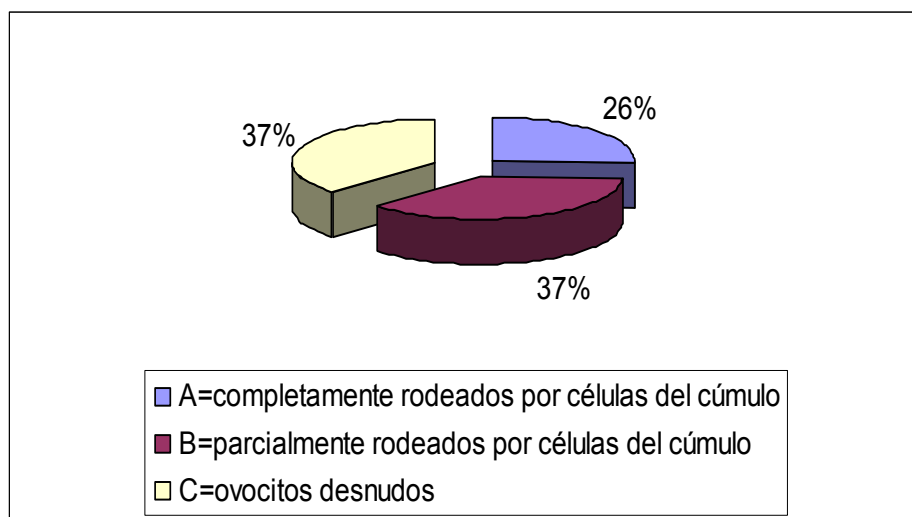


Gráfico 1: Porcentaje de COCs obtenidos, según la integridad de cúmulos en G1 (eCG), en ovejas (n = 35).

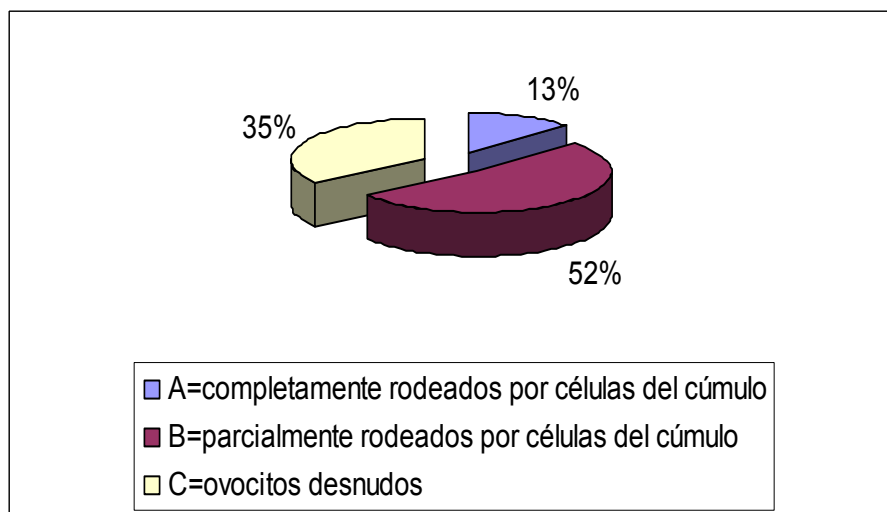


Gráfico 2: Porcentaje de COCs obtenidos, según la integridad de cúmulos en G II (control), en ovejas (n = 23).

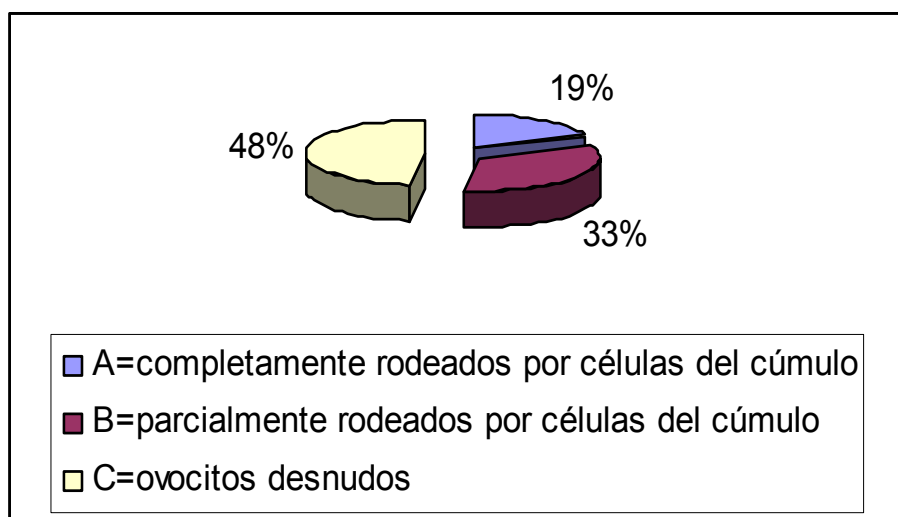


Gráfico 3: Porcentaje de COCs obtenidos, según la integridad de cúmulos en GI (eCG) folículos < 5mm, en ovejas (n = 21).

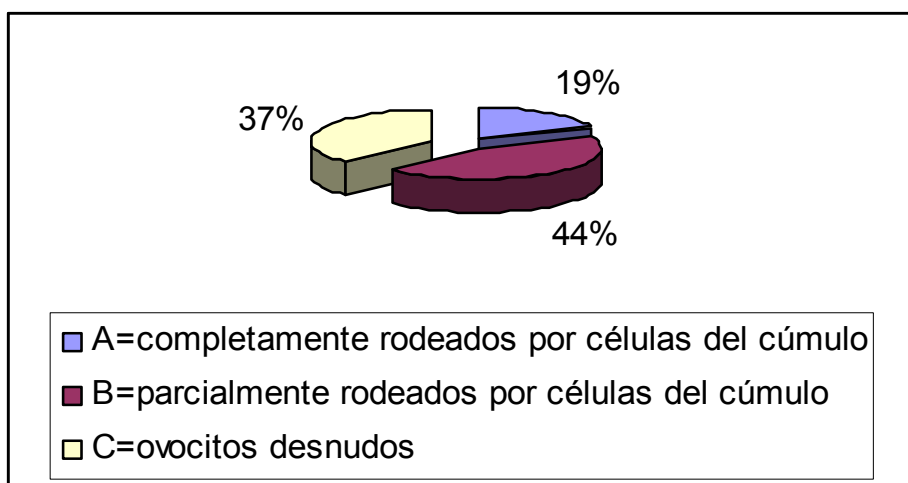


Gráfico 4: Porcentaje de COCs obtenidos, según la integridad de cúmulos en GII (control) folículos < 5mm, en ovejas (n = 16).



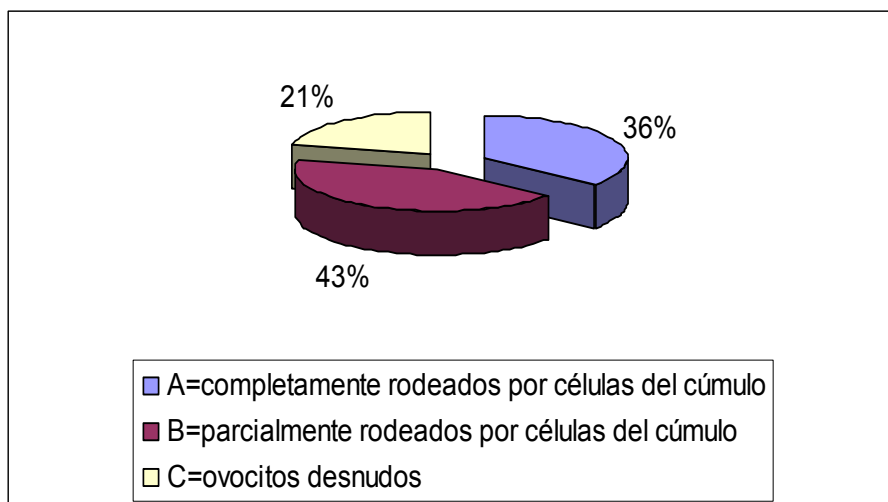


Gráfico 5: Porcentaje de COCs obtenidos, según la integridad de cúmulos en G1 (eCG) folículos > 5mm, en ovejas (n = 14).

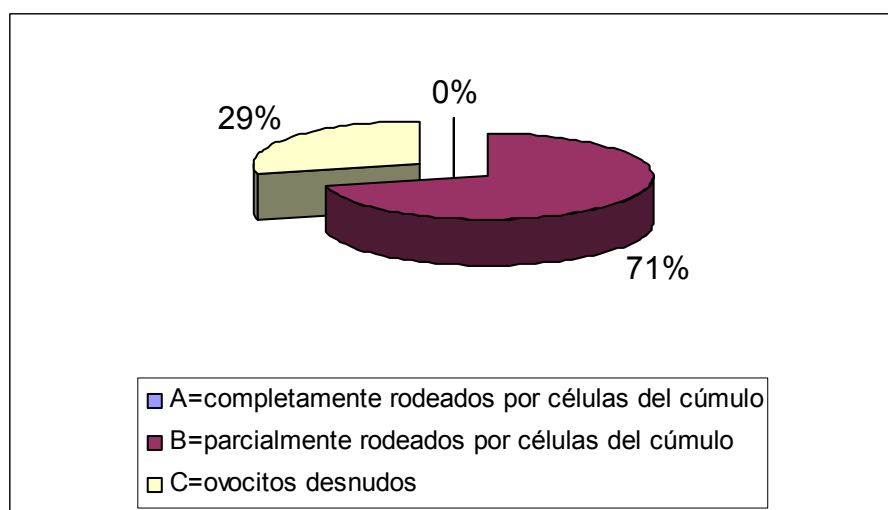


Gráfico 6: Porcentaje de COCs obtenidos, según la integridad de cúmulos en G2 (control) folículos > 5mm, en ovejas (n = 7).

## 6. DISCUSIÓN

Las laparoscopías se realizaron sin dificultades. Sin embargo, se requiere de un período de entrenamiento para lograr la manipulación del útero a través de fórseps logrando una adecuada exposición del ovario para puncionar los folículos. De hecho, hubo un periodo preliminar de ensayo en el cual se trabajó con tres ovejas durante un tiempo de tres meses, realizando dos intervenciones laparoscópicas por semana. A través de éstas, se fue adquiriendo experiencia, perfeccionando la técnica y reduciendo el tiempo de exposición a las laparoscopías. La punción folicular mediante laparoscopia demostró ser una técnica confiable y repetible para obtener ovocitos de ovejas donantes vivas. Esta técnica ha sido utilizada también en terneras (Herrera 2000).

Dentro del estudio, una oveja murió posiblemente a causa de susceptibilidad al tranquilizante; esta oveja fue reemplazada e incorporada al grupo, llevando a cabo sin alteraciones el desarrollo del experimento.

La acepromacina al ser un tranquilizante y antiemético de rápida acción, produce sedación y relajación muscular, reduciendo así la actividad espontánea. Su utilización fue adecuada, porque permitió trabajar con tranquilidad y además hubo una rápida recuperación de los animales, facilitando el retorno de las ovejas a su lugar de origen inmediatamente finalizadas las laparoscopías.

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

La bomba de aire comprimido, que se conectó directamente al laparoscopio proporcionó un adecuado neumoperitoneo, teniendo por objeto desplazar las vísceras para aumentar el espacio de trabajo entre éstas y la pared abdominal, dejando así más visible el tracto reproductivo.

Una de las situaciones presentadas con frecuencia, fue que la vejiga se observaba pletorica de orina y el rúmen se encontraba tapando el tracto reproductivo, lo cual dificultaba la observación, ubicación y manipulación del útero y ovarios. Esto se solucionó, desplazando suavemente y en sentido caudal la vejiga y en sentido craneal el rúmen, con la superficie dorsal del fórseps, permitiendo de esta manera una mejor visualización y utilización del material laparoscópico.

En ciertas ocasiones, la óptica del laparoscopio se vio borrosa debido a dos causas: la primera causa fue 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 en donde 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. Esta dificultad fue descrita por Herrera (2000).

Al momento de realizar las punciones de los folículos, se procedía a esconder la aguja de punción dentro del trocar hasta llevarla al campo visual con el fin de evitar o disminuir 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.

En relación a la cuantificación de la respuesta a la estimulación gonadotrófica para el crecimiento folicular múltiple (cuadro 1), se observa en las ovejas con tratamiento una población de folículos totales  $13,6 \pm 1,2$  (media  $\pm$  d.e) superior a lo registrado en el grupo de ovejas sin tratamiento  $9 \pm 2,1$  (media  $\pm$  d.e).

En el Cuadro 1 se puede observar que el tratamiento con gonadotrofinas produjo estimulación del crecimiento folicular; expresada en un número mayor de folículos en el Grupo I ( $P < 0,05$ ) mostrando diferencias significativas entre animales tratados y no tratados.

En cuanto a los resultados obtenidos en relación a la población de folículos totales (media  $\pm$  d.e) a partir de las aspiraciones foliculares realizadas a folículos menores a 5 mm, si se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre ambos grupos, no encontrándose diferencias significativas para las categorías de los folículos mayores a 5mm.

La hipótesis que plantea que un tratamiento previo con eCG aumenta la recuperación de COCs por laparoscopia en el ovino, se sustenta puesto que el tratamiento gonadotrófico utilizado para obtener crecimiento folicular múltiple logró una respuesta adecuada en la gran mayoría de las ovejas, observando una mayor cantidad de COCs recuperados en los grupos tratados.

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 folículo el estilete no haya llegado al lumen folicular, o debido a la presión con la que se trabajo al momento de la aspiración, o por la formación de pequeños coágulos dentro de la aguja que impedían el libre paso del medio a los tubos.

De acuerdo a su morfología y calidad, se encontro un un 20,7 % de COCs categoría A (totalmente rodeados por células del cúmulo), 43,1 % B (parcialmente rodeados por células del cúmulo) y un 36,2 % de los COCs se encontraban desnudos.

Algunos estudios arrojan tasas de recuperación de COCs mediante laparoscopia en caprinos con valores que varían entre 90% (Pierson 2005), 80% (Baldassarre 2007) y 33 % (Alberio 2002).

La técnica de recuperación de ovocitos en ovejas demostró ser aplicable, ya que se consiguió obtener ovocitos luego de un tratamiento gonadotrófico con una tasa de recuperación de 42,7% para el grupo de ovejas con tratamiento y de un 42,6% para el grupo sin tratamiento.

En cuanto a la tasa de recuperación fue de alrededor de 43% para ambos grupos. Se puede comparar con resultados obtenidos en trabajos similares realizados en la Universidad Austral de Chile, en los cuales los porcentajes de recuperación varían entre un 59,6% (Mogollón 2003) y un 81,6% (Herrera 2000). Los resultados obtenidos por Neira (2006) fueron de 29,8%. En comparación, la tasa de recuperación obtenida puede considerarse baja y a esto debemos consignar variables que pueden afectar la tasa de recuperación como la presión de aspiración, el diámetro y tipo de bisel de la aguja, la experiencia del operador y el excesivo tamaño de los folículos.

Como alternativa a la laparoscopia, surge la ultrasonografía, técnica de gran uso en yeguas y vacas, que se está usando recientemente para estudios de crecimiento folicular, básicamente ondas foliculares, con la creación de transductores sensibles (7.5 MHz) lo que abre posibilidades de aplicación en rumiantes menores por ser una técnica menos invasiva.

Sin embargo, no hay dudas de que la aspiración folicular por laparoscopia continuará siendo la técnica más eficiente para el abastecimiento de ovocitos para uso en biotecnologías reproductivas avanzadas (transgenesis y clonación) (Baldassarre 2007).

De lo expuesto anteriormente se puede concluir que:

1. El método de aspiración folicular a través de laparoscopia quedó establecida.
2. El tratamiento gonadotrófico influyó en el número de folículos puncionables en las ovejas, para la categoría de folículos menores a 5 mm.
3. El tratamiento gonadotrófico no influyó en la tasa de recuperación de COCs.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alberio R, J Olivera, A Roche, J Alabart, J Folch. 2002. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Ruminant Research* 46, 81-87.
- Avery TL, ML Fahning, EF Graham. 1962. Investigations associated with the transplanted of the bovine ova. II Superovulation. *J Reprod Fért* 3, 212-217. Citado por, Sciarresi IA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Baldassarre H. 2007 Aplicaciones prácticas de la producción de embriones *in vitro* en la especie caprina. *Bras Reprod Anim* 31, 261-267.
- Baril G, P Brebion, P Chesne. 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.
- Celestinos M. 2003. Evaluación de la sobrevivencia *in vitro* de embriones de coneja bipartido antes y después de la vitrificación. Tesis de Magíster en Ciencias Mención Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Correa JE. 1972. Primer nacimiento de un cordero en Chile logrado por trasplante de ovulo. *Arch Med Vet* 4, 1 - 4.
- Cueto M, A Gibbons, R González. 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 IC, JE Correa. 1984. Inducción de superovulación y transferencia de embriones en oveja. *Agro Sur* 12, 6-10.

Driancourt MA. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35, 55-79.

Galli C, G Grotti, C Notari, P Turini, R Duchi, G Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55, 1441-1357.

Gordon I. 1997. Reproduction in Sheep and Goats. Controlled reproduction in farm animals series. Vol. 2. CABI Publishing. Cambridge. Citado por, Stockebrand C. 2003. Desarrollo de una técnica asistida por laparoscopia para recolección de embriones de ovejas. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Gordon I, H Lu. 1990. Production of embryos in Vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33, 77-87.

Hafez ESE. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ta ed., Interamericana McGraw-hill, México.

Herrera I. 2000. Efecto del tratamiento repetido con FSH + eCG en la respuesta ovárica y aspiración folicular vía laparoscópica en terneras prepúberes. *Memoria de Titulación* Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Holland EJ, BM Bindon, LR Piper, J Thimonier, KA Cornisa, HM Radford. 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and midventral rotules. *Anim Reprod Sci* 4, 127-135.

Jainudeen MR, ESE Hafez, JA Lineweaver. 1966. Superovulation in the calf. *J Reprod Fert* 12, 149-153.

Lambert RD, C Bernard, JE Rioux, R Beland, D D'amours, A Montreal. 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: Technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 39, 237 (Abstr.).

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

- López C. 2004. Supresión del efecto de dominancia folicular en protocolos de estimulación de ovárica en ganado ovino mediante la administración de una dosis única de antagonista GnRH. Madrid.
- Mariana JC, D Monniaux, MA Driancourt, P Mauleon. 1991. Folliculogenesis. and "Reproduction in Domestic Animals". 4th Edn. Ed. P.T. Cupps Academic Press, San Diego, pp. 119-171.
- Mc Donald LE. 1981. Reproducción y endocrinología veterinaria 2da ed., Interamericana, México.
- Mellisho E. 2005. Efecto de la progesterona en la capacidad meiótica y desarrollo de ovocitos de terneras prepúberes. Tesis de Magíster en Ciencias Mención Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Mogollón G. 2003. Efecto del tratamiento gonodotrófico superovulatorio en la vaca, sobre la dinámica folicular y la tasa de recuperación de ovocitos vía transvaginal guiada por ultrasonido. Tesis de Magíster en Ciencias. Mención Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Neira M. 2006. Estudio de cinética folicular y punción transvaginal guiada por ultrasonografía en terneras prepúberes. *Memoria de Titulación* Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Nelson TA, A Wolf. 1983. Field laparoscopy of female white-tailed deer. *J Wild Life* 47, 1213-1216.
- Onuma H, J Hahn, RH Fotte. 1970 Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of superovulated ova in prepuberal cattle. *J Reprod Fert* 21, 119-126.
- Pavez CH, JE Correa. 1988. Estudio laparoscópico seriado del aparato reproductivo de la oveja a través del ciclo estral y gestación temprana. *Arch Med Vet* 1, 64 - 68.
- Pierson J, B Wang, N Neveu, L Sneek, F Côté, CN Karatzas, H Baldassarre. 2005. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod Fert and Development* 16, 795-799.

- 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. 3ra ed. Editorial Acribia, A. Zaragoza, España.
- Rubianes E, T Castro, V Viñoles, R Ungerfeld, B Carvajal, S Kmaid. 1995. Facultad de superovulación y transferencia de embriones en ovinos. Departamento de fisiología Veterinaria Montevideo, Uruguay.
- Sciarresi LA. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Seidel GE, Jr LL Larson, RH Foote. 1971. Effects of age and gonadotrophin treatment on superovulation in the calf. *J anim Sci* 33, 617–622.
- Silva E. 1988. Estudio de superovulación en terneras prepúberes. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Smidt D, F Ellendorff. 1972. Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales domésticos zootécnicos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Stockebrand C. 2003. Desarrollo de una técnica asistida por laparoscopia para recolección de embriones de ovejas. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Vivanco W. 2000. Transferencia de embriones en la especie ovina y caprina. En: Biotecnología de la reproducción. Editado por: Palma GA. 2001.



## 8. ANEXOS.

### 8.1 Anexo fotografías.



A. Bomba de aire comprimido



B. Fuente de luz



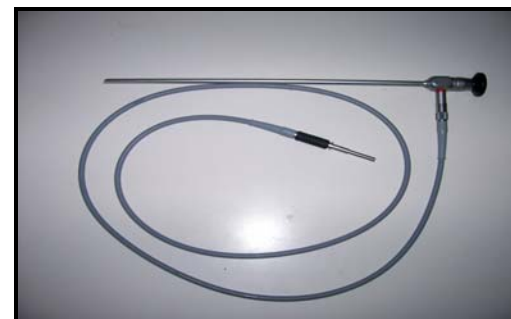
C. Bomba de vacío



D. Punzones y trocares



E. Fórceps de sujeción atraumático



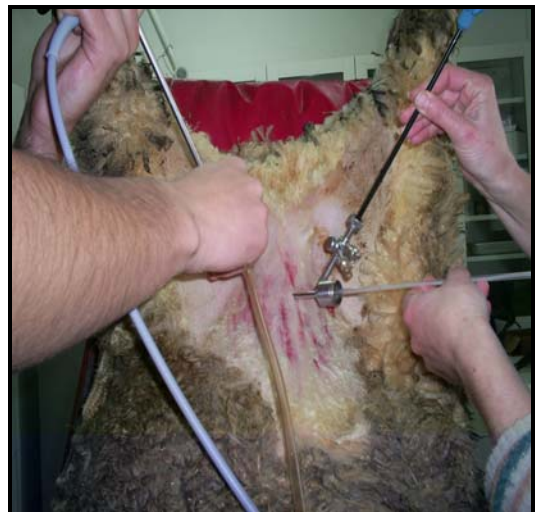
F. Laparoscopia completo unido a un cable de fibra óptica.



G. Oveja colocada en camilla con abdomen depilado.



H. Instrumentos (laparoscopio y fórceps de sujeción) insertos en el abdomen de una oveja.



I. Inserción de aguja de punción a través de un trocar en abdomen de oveja.

## 9. AGRADECIMIENTOS.

Al finalizar mi trabajo doy mis agradecimientos a todas aquellas personas que colaboraron para la realización de este informe y que me alentaron a seguir adelante y alcanzar este momento crucial de mi vida, y en forma muy especial a:

- A mis padres y hermanos por el apoyo incondicional y la confianza que han depositado en mí durante todos mis años como estudiante. A mi padre que aunque no me alcanzo a ver en esta etapa tan importante, supo darme en vida sabios consejos y me brindo todo su cariño, y a mi madre por ser una mujer excepcional y admirable que con comprensión y esfuerzo siempre me a ayudado a cumplir mis objetivos.
- A mi patrocinante Doctor Jorge Correa por abrimme las puertas de este instituto por su paciencia, confianza, guía y valiosa colaboración en este trabajo, así como a los profesores que intervinieron en todas las etapas de mi enseñanza y me entregaron las herramientas necesarias para concluir mi educación.
- A Gabriela Silvers y Rubén Nempu por su buena disposición y cooperación en la realización de la parte práctica de esta memoria, y a todos los que componen el IRA, por su buena voluntad, simpatía y calidez que demostraron en todo momento.
- A mis amigos con los cuales compartí buenos momentos por tanto tiempo e hicieron de Valdivia una grata ciudad, y una experiencia inolvidable.
- A todas aquellas personas relacionadas conmigo que de alguno u otro modo contribuyeron a que concluyera con éxito esta etapa de mi vida
- Por ultimo agradezco al Proyecto FIA – PI – C – 2004 – 1 – P - 047, “Desarrollo implementación de transferencia de embriones y producción *in vitro* de embriones mediante laparoscopia en rumiantes menores”, por el financiamiento de esta memoria de título.