

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

**ESTUDIO DE CINÉTICA FOLICULAR Y PUNCIÓN TRANSVAGINAL GUIADA  
POR ULTRASONOGRAFÍA EN TERNERAS PREPÚBERES.**

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

**MARCELO ADOLFO NEIRA ULLOA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2006**

Con cariño a mi familia, en especial a mis  
padres por todo su inagotable amor y ejemplo de  
vida. A Tatiana por tu amor y por tu maravillosa  
forma de ser.

PROFESOR PATROCINANTE:

---

DR. JORGE CORREA S.

PROFESORES EVALUADORES:

---

DR. PEDRO CONTRERAS B.

---

DR. MARIO MARTÍNEZ D.

FECHA DE APROBACIÓN:

01 MARZO 2005.

## ÍNDICE.

Capítulo	Página
1.- RESUMEN	1
2.- SUMMARY	2
3.- INTRODUCCIÓN	3
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	11
5.- RESULTADOS	18
6.- DISCUSIÓN	23
7.- BIBLIOGRAFÍA	26
8.- ANEXOS	32
9.- AGRADECIMIENTOS	34

## 1. RESUMEN.

La utilización de terneras prepúberes como donantes de ovocitos para programas de fecundación *in vitro* y producción de embriones puede acortar el ciclo reproductivo de las vacas y permitir la aplicación de pruebas de progenie en éstas, al acortar el lapso intergeneracional.

El propósito de esta tesis fue estudiar la actividad folicular mediante ultrasonografía vaginal en terneras prepúberes (14 a 16 semanas de edad) y luego, recuperar ovocitos a través de punción transvaginal guiada por ultrasonografía.

Seis terneras Holstein fueron ecografiadas día por medio durante un mes obteniendo un registro gráfico de la presencia y tamaño folicular. Posteriormente se aplicó un tratamiento gonadotrófico mediante una dosis única de 1.250 UI de eCG intramuscular, seguido, 120 hrs después, de una dosis única de 1.000 UI de hCG intramuscular. La respuesta ovárica fue evaluada mediante el estudio ultrasónico antes y después del tratamiento. Las punciones ováricas se realizaron 14 a 18 hrs posterior a la inyección de hCG.

El seguimiento ultrasónico permitió ver desarrollo de folículos, crecimiento y dominancia de uno de ellos y cierta actividad folicular equivalente a la descrita en animales adultos. Cinco de seis terneras respondieron al tratamiento hormonal con aumento en el número de folículos mayores de 5 mm. Antes del tratamiento hubo  $10 \pm 2,3$ ; 7 – 14 (promedio  $\pm$  ds; rango) de folículos observados. Posterior al tratamiento hubo  $19 \pm 8,1$ ; 6 - 30 (promedio  $\pm$  ds; rango) de folículos haciendo notar que el 95% de ellos fue mayor a 7 mm. La punción folicular se realizó sin inconvenientes punzándose todos los folículos mayores a 3 mm obteniéndose una tasa de recuperación de 29.8%, con un 85% de cúmulos expandidos.

Se concluye que la técnica de ultrasonografía permite determinar actividad folicular prepuberal, además la punción transvaginal guiada por ultrasonografía puede ser un método de obtención de ovocitos de terneras de 3 a 4 meses de edad, sugiriendo que estos animales pudieran ser incluidos en programas reproductivos. Si esto fuese acompañado por métodos adecuados de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de embriones pudiera constituirse en una nueva herramienta para el desarrollo ganadero bovino en Chile

**Palabras claves:** terneras, ovocitos, crecimiento folicular, punción transvaginal, desarrollo folicular múltiple.

## 2. SUMMARY.

### STUDY OF FOLLICULAR KINETIC BY ULTRASONICALLY GUIDED TRANSVAGINAL PUNCTURE IN PREPUBERAL CALVES.

The use of prepuberal calves as oocyte donors for in vitro fertilization programs could reduce cattle reproductive cycle allowing application of progenie tests and decreasing the generation interval.

The aims of this thesis were to study the follicular activity in prepuberal calves (14 to 16 weeks old) by means of vaginal ultrasonography and then, to set up the ovum pick up ultrasonography (OPU) recovery.

Six Holstein calves were monitored every other day during a month, obtaining a graphical record of number and size of follicles. Later, a single intramuscular injection of 1.250 UI of eCG was given, followed 120 hrs later by a single im injection of 1.000 UI of hCG. The ovarian answer was evaluated by means of the ultrasonic exams before and after the gonadotropin treatment. The ovarian punctures were made 14 to 18 hrs after the eCG injection.

The ultrasonic study allowed to observe development of follicles, establishment of dominant follicles and follicular activity equivalent to those described in cows. Five out of six calves responded to the hormonal treatment with an increased number of follicles greater of 5 mm. Before the treatment there was  $10 \pm 2.3$  and 7 - 14 (mean  $\pm$  sd and range) observed follicles. After the treatment there was  $19 \pm 8.1$  and 6 - 30 (mean  $\pm$  sd and range) of follicles with a 95% of them greater than 7mm. The follicular puncture was made without difficulty, puncturing all the follicles greater than 3mm. The 28.9 of recovery rate was obtained with a 85% of expanded cumulus.

This study concludes that transvaginal puncture technique guided by ultrasonography can be used in calves 3 or 4 months old and if it is accompanied by suitable methods of maturation, fertilization and in vitro culture could become a new tool for cattle development in Chile.

**Key words:** prepuberal calves, follicular activity, ovum pick up, multiple follicular development.

### 3. INTRODUCCIÓN.

La biotecnología en la reproducción animal ha alcanzado un papel fundamental en medicina veterinaria con especial desarrollo y aplicación en la clínica de animales mayores, en pos de una mayor difusión de genética valiosa y alcanzar niveles cada vez más altos de producción. El desarrollo en el estudio de estas tecnologías ha experimentado un explosivo avance en las últimas dos décadas transformándose en piedra angular de recientes avances en medicina humana y en diferentes ámbitos científicos, como por ejemplo la preservación de especies en peligro de extinción.

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

De las biotecnologías más aplicadas actualmente podemos citar la recuperación, maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos, congelación y transferencia de embriones y clonación, que pueden lograr un papel trascendental en la producción de proteína para el consumo humano. Esto no significa que estas técnicas serán usadas a gran escala en el corto o mediano plazo, pero el solo hecho de conocerlas incentivará su desarrollo con la esperanza de utilizarlas en esquemas dirigidos de reproducción, que tiendan necesariamente a aumentar la producción (Del Campo, 1985).

Hoy en día entre esta gama de posibilidades, la transferencia de embriones (TE), especialmente en bovinos, se presenta con un mayor desarrollo y aplicación a nivel mundial, sin ser aún masiva en nuestro país, consagrándose como eje fundamental en el desarrollo reproductivo en medicina veterinaria y como base de los planes futuros de aumento de la masa ganadera bovina nacional.

En el mundo, la TE se viene desarrollando desde hace tiempo, conociéndose ampliamente sus beneficios, ya Foote y Onuma (1970) postulaban la utilización de hembras genéticamente superiores como donantes, incrementando así el número de sus crías. Además esta técnica posibilitaría el transporte de embriones a lugares distantes, en lugar de movilizar animales, permitiendo además la realización de experimentos genéticos. En nuestro país la TE en bovinos se constituyó en realidad en 1979 con el nacimiento de los primeros terneros obtenidos con esta tecnología (Correa y col., 1979).

Para una adecuada implementación de esta técnica es necesario considerar ciertos aspectos como la obtención y conservación de gametos, lo cual ha ido evolucionando en especial la recuperación de gametos masculinos, ya que desde hace tiempo se conocen las técnicas apropiadas de congelación con lo cual se logran mantener verdaderos bancos

genéticos. En tanto las técnicas de recuperación y mantención de los gametos femeninos se han ido desarrollado en los últimos años, lo cual ha permitido el trabajo con ovocitos provenientes de animales vivos.

Otro aspecto importante a considerar es que en la TE deben usarse como donantes vacas de alta calidad, por lo tanto, es importante conocer las características genéticas de éstas, siendo lo ideal realizar pruebas de progenie similar a las que se realizan en toros usados en centros de inseminación artificial. Lamentablemente su implementación está limitada por la amplitud del ciclo reproductivo de la hembra bovina, además del escaso número de crías que ella tiene y el tiempo de espera para conocer las características productivas de sus descendientes (Silva, 1988).

### **3.1 UTILIZACIÓN DE TERNERAS COMO DONANTES DE OVOCITOS.**

La utilización de hembras prepúberes como donantes de ovocitos responde a las características reproductivas de las terneras, las cuales desde temprana edad ya presentan un potencial reproductivo factible de explotar. Además, están las ventajas comparativas que éstas presentan en la investigación y desarrollo de trabajos experimentales respecto de animales adultos tales como la ausencia de ciclicidad, lo que permite diseñar experimentos a conveniencia, sin restricción de sincronizaciones previas. La facilidad de manejo y su menor costo económico de mantención son puntos importantes al momento de realizar experimentos relacionados con la obtención de ovocitos desde animales vivos (Herrera, 2000.).

Una de las razones fundamentales de incorporar hembras prepúberes como donantes de embriones, es que esto podría acortar el ciclo productivo de la hembra y a la vez contribuiría a la ejecución de pruebas de progenie en vacas al acortar el lapso intergeneracional (Onuma y col., 1969).

La recolección de embriones en terneras prepúberes (2 meses de edad), e incluso, desde fetos, podría tener un impacto significativo en esquemas de mejoramiento genético reduciendo substancialmente el intervalo generacional. Estimaciones hechas por Louhis (1995) sobre el impacto de donadoras en la obtención de toros para prueba de progenie, muestran un incremento del 22% en el progreso genético por sobre la ganancia obtenida cuando se usan hembras adultas (Mogollón, 2003).

Todo esto basado en la potencialidad reproductiva que presentan las terneras al momento del nacimiento ya que contiene una dotación de alrededor de 133.000 ovocitos en sus ovarios (Erickson, 1966). Además se ha observado que durante el período prepuberal existe crecimiento folicular y posterior regresión sin que exista ovulación (Sorensen y col., 1959; Erickson, 1966).

Gracias a los resultados obtenidos por Casida y col. (1943), donde fueron capaces de superovular terneras, y lo realizado por Jainudeen y col. (1966), que demostraron que los ovocitos de estos animales prepúberes son fecundables, se forjaron las bases para la



producción de embriones a través de fecundación *in vitro* de ovocitos obtenidos de terneras prepúberes, lo que permitiría obtener crías antes que ellas alcancen un año de vida (Armstrong y col., 1992).

Es importante recordar que la ovogénesis comienza en la vida fetal con la división mitótica de las ovogonias. En determinado momento, estas células se transforman en ovocitos y comienzan el proceso de meiosis, el cual permite obtener una célula haploide capaz de ser fecundada. Luego de comenzada la meiosis, los ovocitos son rodeados por células foliculares (células pregranulosas) y se produce la detención de la misma en el estado de diploteno, profase I, denominado estado dictiático (Buccione y col., 1990).

### **3.2 ESTIMULACIÓN GONADOTRÓFICA EN TERNERAS.**

La respuesta positiva que presentan los ovarios de terneras prepúberes a la estimulación hormonal gonadotrófica exógena ha permitido implementar variados estudios de recuperación de ovocitos, todo esto apoyado en los resultados obtenidos primeramente por Casida y col. (1943), en el cual demostraron que es posible inducir ovulación y superovulación (desarrollo y ovulación de un número mayor de folículos que lo usual, según Avery y col., 1962) en terneras prepúberes mediante el uso de gonadotropinas. Más tarde Marden (1953), realizó estudios de la respuesta ovárica en terneras prepúberes de diferentes edades.

Investigaciones posteriores han demostrado diferentes rangos de respuesta en las combinaciones de las diferentes hormonas gonadotróficas usadas en este tipo de animales Jainudeen y col., (1966); Onuma y col., (1969 y 1970); Seidel y col., (1971); Testart, (1972) y actualmente las estimulaciones hormonales utilizadas en la recuperación de ovocitos desde terneras como Irving y col., (1993); Brogliatti y col., (1995) y Fry y col., (1998) y especialmente los trabajos realizados en el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile por Sciarresi (1984), Silva (1988), Herrera (2000) sirvieron de guía para la elección de la combinación de hormonas gonadotróficas utilizadas en este trabajo.

Las hormonas gonadotróficas pueden ser, por su efecto, sustancias que inducen crecimiento folicular (folículo estimulante) o 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 más utilizadas tanto para estimular el desarrollo folicular, como la maduración de los ovocitos son la Hormona Folículo Estimulante (FSH), Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (eCG), Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), Hormona Luteinizante (LH), Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).

### **3.2.1 Hormona Folículo Estimulante (FSH).**

Hormona de origen glucoproteico secretada por las células basófilas del lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis). Una de sus principales acciones es estimular el crecimiento y maduración del folículo ovárico. Además en presencia de LH estimula la producción de estrógenos por ovarios y testículos (Hafez, 1996).

En el mercado el producto más utilizado es la FSH-p (porcina) la cual es la gonadotropina de mayor uso para la inducción de crecimiento folicular (tanto en terneras como en animales adultos), consistiendo generalmente su administración en regímenes de 6 a 8 inyecciones a intervalos de 12 horas, en dosis decrecientes o en dosis iguales.

Se han intentado implementar regímenes de aplicación de una sola dosis de FSH-p subcutáneamente, pero los resultados obtenidos de regímenes consistentes en varias aplicaciones han demostrado mayores respuestas foliculares y mejor calidad de ovocitos recuperados (Stubblings y col., 1993).

### **3.2.2 Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (eCG).**

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

La eCG tiene efectos biológicos tanto de FSH como de LH, los primeros son los dominantes, por lo tanto, es ampliamente usada en la inducción de la superovulación. El origen de esta hormona está en las yeguas preñadas donde se aísla desde la sangre y no se encuentra en la orina. (Hafez, 1996).

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

Esta hormona se ha utilizado ampliamente con el propósito de inducir crecimiento folicular múltiple en terneras, administrándola sola (Monniaux y col., 1983; Brogliatti y col., 1995) o en conjunto con la hormona folículo estimulante de origen porcino (FSH-p) (Armstrong y col., 1993; Tervit y col., 1995).

Las dosis de eCG usadas en diversos trabajos varían en dosis totales desde 200 hasta 2.000 UI. Mellin y col., (1975) usaron dosis altas de eCG (3.000 UI), pero el aumento de la dosis sobre un determinado nivel no influyó marcadamente la respuesta ovulatoria.

### **3.2.3 Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).**

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

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

Mellin y col. (1975) comprobaron en terneras, que 2 hrs posteriores a una dosis parenteral de GnRH se produce un pick de LH, el cual retorna a niveles basales 6 hrs posteriores a su aplicación. Recientemente Fry y col. (1998) utilizaron dosis de 40 µg de GnRH para inducir maduración folicular *in vivo* de ovocitos en terneras prepúberes.

### **3.2.4 Hormona Luteinizante (LH).**

Es una hormona glucoproteíca secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis que induce maduración del folículo en crecimiento y posteriormente ovulación, siempre que haya actuado previamente alguna hormona con acción folículo estimulante. Las oleadas de LH y FSH también inducen las fases finales de la maduración del ovocito precisamente antes de la ovulación (Hafez, 1996).

La acción de LH en el ovario es estimular la síntesis de esteroides en las células de la teca y granulosa e inducir un rápido y gran incremento del flujo sanguíneo al ovario (Armstrong, 1970).

Las concentraciones tónicas o basales de LH actúan conjuntamente con las de FSH para inducir la secreción de estrógenos a partir del gran folículo ovárico. La oleada preovulatoria de hormona luteinizante causa la ruptura de la pared folicular y la ovulación (Hafez, 1996).

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

La administración de LH posterior a un tratamiento con eCG o FSH aumenta el número de ovulaciones y número de embriones recuperados en terneras prepúberes (Mickelsen y col., 1978).

### **3.2.5 Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG).**

Es una hormona glucoproteíca sintetizada por las células sinciotrofoblásticas de la placenta de los primates. Ésta se encuentra tanto en la sangre como en la orina (Hafez, 1996). Alcanza su valor máximo durante las primeras 10 a 12 semanas de gestación disminuyendo a cantidades muy bajas durante la segunda mitad de la gestación (Sherwood y col., 1977).

La actividad principal de esta hormona es semejante a LH con cierta actividad menor de FSH. La subunidad alfa de esta hormona tiene 92 aminoácidos y dos cadenas de carbohidratos similar a la homóloga de la LH de la mujer, cerda, oveja y vaca (Hafez, 1996).

La hCG administrada sola a semejanza de LH no es capaz de producir ovulación por lo que requiere de un tratamiento con una hormona previa con actividad foliculo estimulante para que produzca ovulación múltiple (Beridian y col., 1975).

Para lograr una alta recuperación de ovocitos madurados *in vivo*, se complementa la estimulación folicular con la administración intramuscular o endovenosa de hCG, en dosis de 1.500 a 3.000 UI al final del tratamiento (Armstrong y col., 1991; Looney y col., 1995). Se recomienda la recuperación entre las 18 a 22 hrs posteriores a la aplicación, ya que se reportan ovulaciones posteriores a este tiempo. (Armstrong y col., 1992).

### **3.3 RECUPERACIÓN DE OVOCITOS DESDE TERNERAS.**

Como se expuso anteriormente el uso de terneras como donantes de gametos es ampliamente conocido y desde los primeros trabajos de superovulación a través de inducción hormonal se han tratado de desarrollar diferentes técnicas para la utilización de estos ovocitos.

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 la laparotomía en primera instancia (Silva, 1988), con resultados poco alentadores por tratarse de una técnica muy invasiva y poco repetible.

Luego se desarrolló la técnica de aspiración folicular mediante laparoscopia (Armstrong y col., 1991; Herrera, 2000), la cual resultó ser menos traumática para las donantes que la laparotomía. 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.

Con el desarrollo y aplicación de la ultrasonografía en veterinaria se ha logrado la aspiración folicular vía transvaginal en terneras (Brogliatti y col., 1995; Fry y col., 1998) que por ser un procedimiento poco invasivo, que no necesita anestesia general y es altamente repetible se perfila como el método idóneo para la obtención de ovocitos desde animales vivos.

### 3.4 ULTRASONOGRAFÍA Y PUNCIÓN VAGINAL.

La idea básica de la ultrasonografía es poder visualizar, en un monitor, imágenes capaces de representar en forma precisa los tejidos vivos dentro del área estudiada, tanto en su estructura interna como externa (Pierson y col., 1988).

Estos equipos emiten sonidos de alta frecuencia, no audibles por el oído humano (2 a 30 MHz). Éste viaja por medio de ondas a través de los diferentes tejidos, gracias a los componentes líquidos de éstos. Por otro lado, dado que la resistencia al paso del ultrasonido es diferente entre ellos, el ultrasonido los atravesará y/o rebotará en grados distintos según la consistencia de éstos. Debido a que el intercambio del ultrasonido es dinámico (se actualiza constantemente), las imágenes se aprecian en movimiento, por lo que se llama “ultrasonografía en tiempo real” (Nyland y col., 1995).

Básicamente, el equipo de ultrasonido está compuesto de dos elementos definidos: el transductor y el procesador de imágenes. Los transductores llevan en su interior pequeños cristales de efecto piezoeléctrico que se contraen y expanden en respuesta a una breve corriente eléctrica, produciendo vibraciones que se traducen en ondas de ultrasonido (muchas veces por cada segundo). Algunas de las ondas rebotan en los tejidos y son reflejadas. Estas ondas que retornan, comprimen y expanden los cristales, produciendo éstos una pequeña corriente eléctrica. De este modo los cristales actúan como emisores y receptores del ultrasonido (Pierson y Ginther, 1988).

El ultrasonido recibido por el transductor, producto de la reflexión de las interfases tisulares, es microprocesado generando una imagen en escala de grises, variando de blanca (una gran proporción de ondas sonoras son reflejadas) a negra (ninguna de las ondas sonoras son reflejadas). Estas interfases frecuentemente producen una línea distinta, que claramente define los límites entre tejidos diferentes.

En los últimos años, los equipos ecográficos han tenido una notable evolución en todos sus aspectos técnicos, lo que ha incentivado toda una gama de aplicaciones en diversas especies animales (Mogollón, 2003).

La ultrasonografía fue inicialmente utilizada en reproducción equina, pero posteriormente, la técnica pareció tener buenas posibilidades de aplicación en la especie bovina (Reeves y col., 1984; Edmonson y col., 1986; Pierson y Ginther, 1987).

Las primeras aplicaciones en reproducción bovina fueron en el estudio de los diferentes cambios físicos observables en el tracto reproductivo, en especial los ocurridos en el ovario, lo que permitió profundizar los conocimientos de los eventos fisiológicos que se desarrollan en esta especie.

Es así como la ultrasonografía hizo posible avances en el entendimiento de la dinámica folicular durante el ciclo estral y otros estados fisiológicos (período prepúber en vaquillas, preñez y durante el posparto temprano) (Mogollón 2003).

En vaquillas prepúberes, el crecimiento de los folículos antrales en el ovario también se produce por medio de ondas. La primera ovulación ocurre en promedio a las 56 semanas de edad, seguido por un ciclo ovulatorio de corta duración (8 días) y luego por un ciclo de duración normal de 21 días (Evans y col., 1994). Estas investigaciones sugieren que los mecanismos endocrinos que conducen a la emergencia, crecimiento y selección de un folículo dominante, son similares entre ondas en el período anovulatorio prepúber y ondas durante los ciclos ovulatorios en hembras maduras.

Callesen y col. (1987) fueron los primeros en usar la ultrasonografía para recolectar ovocitos bovinos. Los autores realizaron la punción folicular en forma transcutánea, luego que el ovario fue ubicado contra la pared abdominal en la región sacro-isquiática por medio de manipulación rectal.

En el año 1988 Pieterse y col., adaptaron la técnica de punción transvaginal guiada por ultrasonografía en el bovino basada en aquella usada en mujeres. Finalmente, esta técnica resultó ser un método poco invasivo, con una alta repetibilidad en la recuperación de ovocitos de donantes vivas. Sus denominaciones habituales como “punción folicular transvaginal”, “recuperación de ovocitos vía transvaginal guiada por ultrasonografía” u “ovum pick up transvaginal” son abreviados como OPU.

Los trabajos posteriores realizados con esta técnica en terneras (Brogliatti y col., 1995; Fry y col., 1998) han demostrado la posibilidad cierta de incorporar terneras prepúberes como donantes de embriones. .

Esta técnica ha sido utilizada también en equinos (Goudet y col., 1997), llamas (Brogliatti y col., 1996) y búfalos italianos del mediterráneo (Boni y col., 1996). Teóricamente, OPU se puede utilizar en cualquier especie, en la cual el dispositivo pueda ser ubicado en la vagina y la manipulación transrectal sea posible.

### **3.5 HIPÓTESIS.**

Es posible recuperar ovocitos en terneras entre 4 y 5 meses de edad mediante punción transvaginal por ultrasonografía.

### **3.6 OBJETIVOS.**

1. Estudiar la actividad folicular en terneras de cuatro a cinco meses de edad.
2. Desarrollar una técnica ultrasónica de punción transvaginal para recuperación de ovocitos en terneras prepúberes.
3. Inducir crecimiento folicular múltiple y maduración *in vivo* de ovocitos por administración de gonadotrofinas en terneras prepúberes, para aumentar la recolección de ovocitos.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Seis terneras Holstein con una edad aproximada de  $115 \pm 8$  días, pertenecientes al fundo “Vista Alegre” de propiedad de la Universidad Austral de Chile, fueron llevadas al pabellón del Instituto de Reproducción Animal y se mantuvieron ahí durante el desarrollo del estudio, siendo alimentadas cada una con 2 kg/d de concentrado de iniciación para terneros, heno y agua *ad libitum*.

### 4.1 ESTUDIO DE CINÉTICA FOLICULAR.

El período de seguimiento de dinámica folicular comenzó con una fase de acostumbramiento por parte de las terneras a la palpación rectal. Al cabo de una semana se logró manipular los ovarios sin mayores dificultades en todas las terneras.

El estudio se llevó a cabo mediante la utilización de un ecógrafo modo – B<sup>1</sup> en tiempo real (Figura 1) provisto de un transductor convexo multiángulo de doble frecuencia (5/7.5 MHz) (Figura 2) con el cual se realizaron ecografías transvaginales a los ovarios de las terneras para determinar la presencia de folículos y el eventual desarrollo de ondas foliculares.

Los registros consistieron en la identificación y medición de los folículos de mayor tamaño en cada ovario y su evolución cada 48 hrs.

Las terneras fueron dispuestas en una manga metálica de sujeción, donde se realizó palpación rectal, previa limpieza de la zona peri anal con alcohol al 70%, utilizando mangas plásticas desechables y abundante aceite mineral (vaselina).

Posteriormente se introdujo el transductor vía vaginal, protegido debidamente con preservativos de látex y lubricado con vaselina siguiendo adecuadamente la anatomía genital. Luego se ecografió uno a uno los ovarios registrando en imágenes cada una de las estructuras relevantes visualizadas, previa ubicación espacial y medición de ellas.

El estudio se realizó durante un período de treinta días, el primer día se determinó en cada una de las terneras la presencia de folículos, su tamaño y ubicación en ambos ovarios, dejando un registro mediante imágenes digitales. Todo esto repetido día por medio permitió elaborar un registro ecográfico donde se pudo establecer la presencia de folículos en diferentes estados de desarrollo, sin llegar a la ovulación, y el desarrollo de posibles ondas foliculares.

---

<sup>1</sup> Pie Medical 240 Parus Vet, Holanda.



Figura 1: Ecógrafo 240 Parus Vet



Figura 2: Transductor convexo multiángulo



## 4.2 ESTIMULACIÓN HORMONAL.

El tratamiento hormonal se constituyó en base a la aplicación de dos hormonas gonadotróficas con el fin de obtener desarrollo múltiple de folículos y maduración in vivo de ovocitos. Para tales efectos se utilizó en cada ternera gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Folligon®)<sup>2</sup> en una dosis única consistente en 1.250 UI vía intramuscular. Previo a esto se procedió a ecografiar cada uno de los ovarios y conjuntamente dejar un registro gráfico de su forma y estado antes de la eventual respuesta hormonal.

Transcurridas 120 hrs desde la primera inyección, se aplicó gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Chorulon®)<sup>3</sup> en una dosis única de 1.000 UI vía intramuscular. Posterior a esto, 18 hrs más tarde (como máximo) se procedió a realizar las punciones.

Con el objetivo de sincronizar la realización de las punciones, se estableció el siguiente calendario de actividades, a fin de programar la punción de ambos ovarios a dos terneras diariamente en días consecutivos (Cuadro 1).

Cuadro 1: Calendario de sincronización y punciones realizad en el estudio.

	Miércoles 01-Oct	Jueves 2 Octubre	Viernes 3 Octubre	Sábado 4 Octubre	Domingo 5 Octubre	Lunes 6 Octubre	Martes 7 Octubre	Miércol 8 Octubre	Jueves 9 Octubre
Nº Ternera									
5004	1250 UI eCG					1000 UI hCG	Punción		
5006	1250 UI eCG					1000 UI hCG	Punción		
5007		1250 UI eCG					1000 UI hCG	Punción	
5008		1250 UI eCG					1000 UI hCG	Punción	
5010			1250 UI eCG					1000 UI hCG	Punción
5012			1250 UI eCG					1000 UI hCG	Punción

## 4.3 PUNCIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL.

<sup>2</sup> Intervet International B.V., Holanda.

<sup>3</sup> Intervet International B.V., Holanda.

Para la realización de la punción folicular (ovum pick-up) transvaginal se utilizó el mismo equipo ultrasonográfico del estudio de cinética folicular, provisto del transductor convexo multiángulo de doble frecuencia con la adición de una guía de aguja de material plástico recubierto internamente con un tubo de acero inoxidable, la cual va fijada en posición dorsal del transductor (Figura 3).

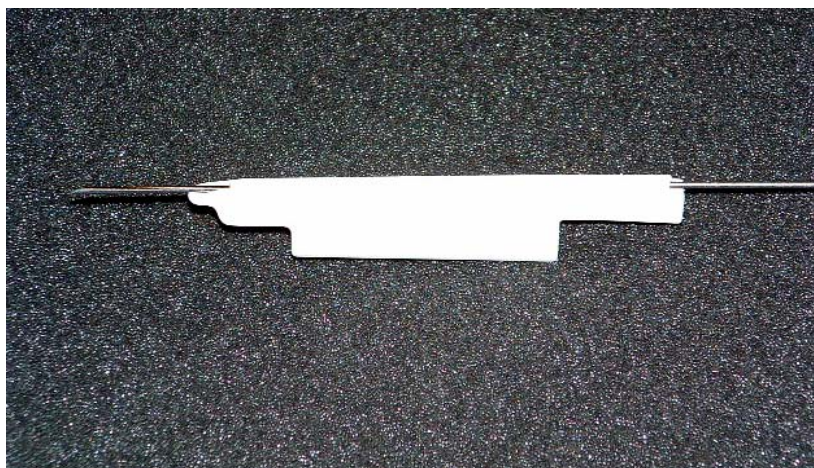


Figura 3: Guía plástica de aguja.

El mecanismo de succión estaba constituido por un sistema que mezcló agujas largas convencionales de punción con agujas desechables (Precision Glide®)<sup>4</sup> de 18 G ½ modificadas, las cuales fueron desprovistas de su porción posterior plástica y reducido su diámetro externo mediante desgaste mecánico, sin alterar la superficie y borde interno. Éstas estaban montadas en una aguja de aspiración no descartable larga de la cual se desgastó en su porción anterior hasta eliminar completamente el bisel, donde se insertaban directamente a presión las agujas desechables.

Esto permitió cambiar cada vez que fuera necesario las agujas, ya que uno de los principales problemas descritos es la pérdida de filo en la punta de la aguja con lo cual se dificulta la punción y se aumenta el daño en el tejido ovárico (Scott y col., 1994).

Las agujas largas son relativamente simples de construir y fáciles de manejar, pero su mayor desventaja es que se desafilan rápidamente. Requieren de afilación regular, mediante la cual nunca alcanzan el estado inicial Simon y col. (1993).

---

<sup>4</sup> Becton Dickinson Ind. Cirúrgica Ltda., Brasil

La succión fue generada por una bomba de vacío, la cual iba conectada a un matraz de seguridad, con la cual se trabajó con una presión de 40 a 60 mm de Hg (Figura 4).



Figura 4: Bomba de vacío.

El líquido folicular obtenido de las punciones fue recepcionado en tubos plásticos estériles de 50 ml <sup>5</sup>, el cual contenía medio de recolección constituido por solución ringer lactato a 39°C, suplementado con suero fetal (1%) y heparina sódica (5.000 UI/lt).

Para la mantención de la temperatura de los tubos y el medio de recolección se utilizó un baño María a temperatura constante (Figura 5).

---

<sup>5</sup> Tubos de centrifugación Falcon® .



Figura 5: Baño Maria con tubos de recolección.

#### 4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos en ambas pruebas realizadas fueron procesados mediante el paquete estadístico “GraphPad Prism TM” versión 4.0 y se utilizó una planilla de cálculo Excel. Los resultados obtenidos se expresaron como medias aritméticas y su error estándar.

Se utilizó como nivel de significancia 0,05 siendo significativo un  $p \leq 0,05$  y no significativo un  $p > 0,05$  (Naranjo y Bustos, 1992). Además se realizaron pruebas inferenciales intergrupos, paramétricas. La metodología estadística aplicada en el análisis de los valores obtenidos fue la siguiente:

- Al cumplirse los resultados de normalidad y homocedasticidad se recurrió al análisis de varianza paramétrico (Anova) de una vía, cuyo objetivo fue comparar promedios de dos grupos de datos (Domenech, 1980).
- Se utilizó la prueba t de Student de datos pareados, para realizar las comparaciones intergrupo de las variables.

## 5. RESULTADOS.

El tacto rectal se logró realizar en todas las terneras desde los 100 días de edad.

Durante el mes de estudio de dinámica folicular no se presentaron inconvenientes y se logró la visualización de las estructuras del ovario y su identificación.

.Durante el período de estudio se logró constatar el continuo desarrollo de folículos, su emergencia en diferente número y tamaño y el predominio de uno o dos de ellos sobre los demás, creciendo en tamaño sin alcanzar diámetros mayores a 1,4 cm y sin producirse ovulación.

En todas las terneras logró establecerse crecimiento folicular ordenado y con subordinación respecto al folículo de mayor tamaño, sin llegar a determinar con certeza los tiempos de emergencia, influenciado esto además por factores técnicos al momento de visualizar los ovarios, como la diferenciación clara de folículos en crecimiento y los que se encontraban en franca involución y en especial la falta de experiencia en la visualización detallada y repetible de los diferentes ángulos del ovario.

A modo de ejemplo se exponen los resultados obtenidos después de un mes de seguimiento (15 observaciones) en la ternera número 5007 (Gráfico1).

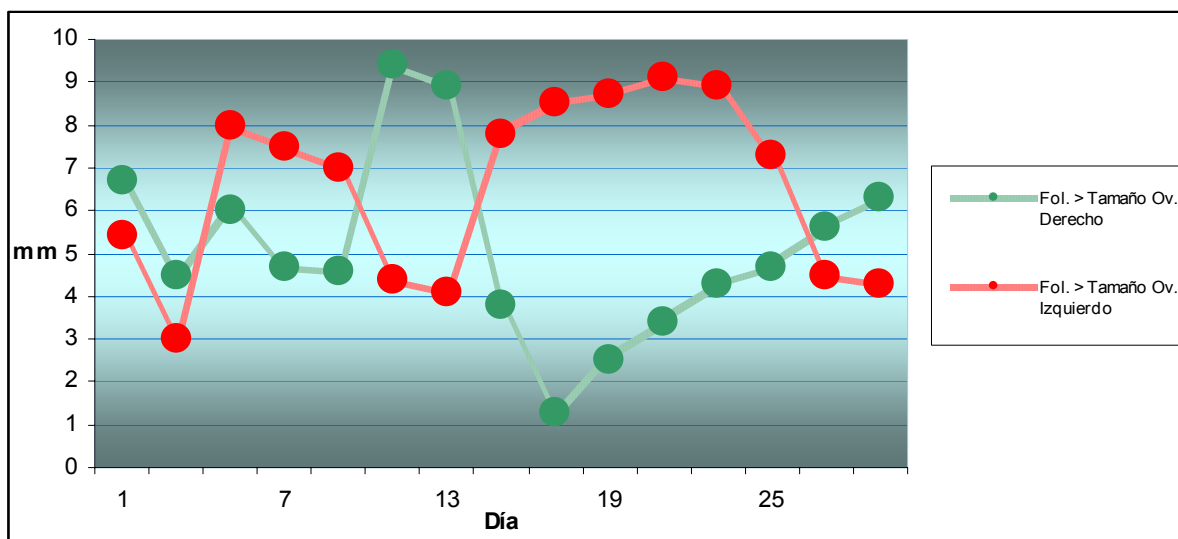


Gráfico 1: Evolución de folículos de mayor tamaño en ambos ovarios de una ternera (5007)

El crecimiento y dominio folicular se ilustra a continuación en la secuencia de imágenes de la ternera 1012 (Figura 6).

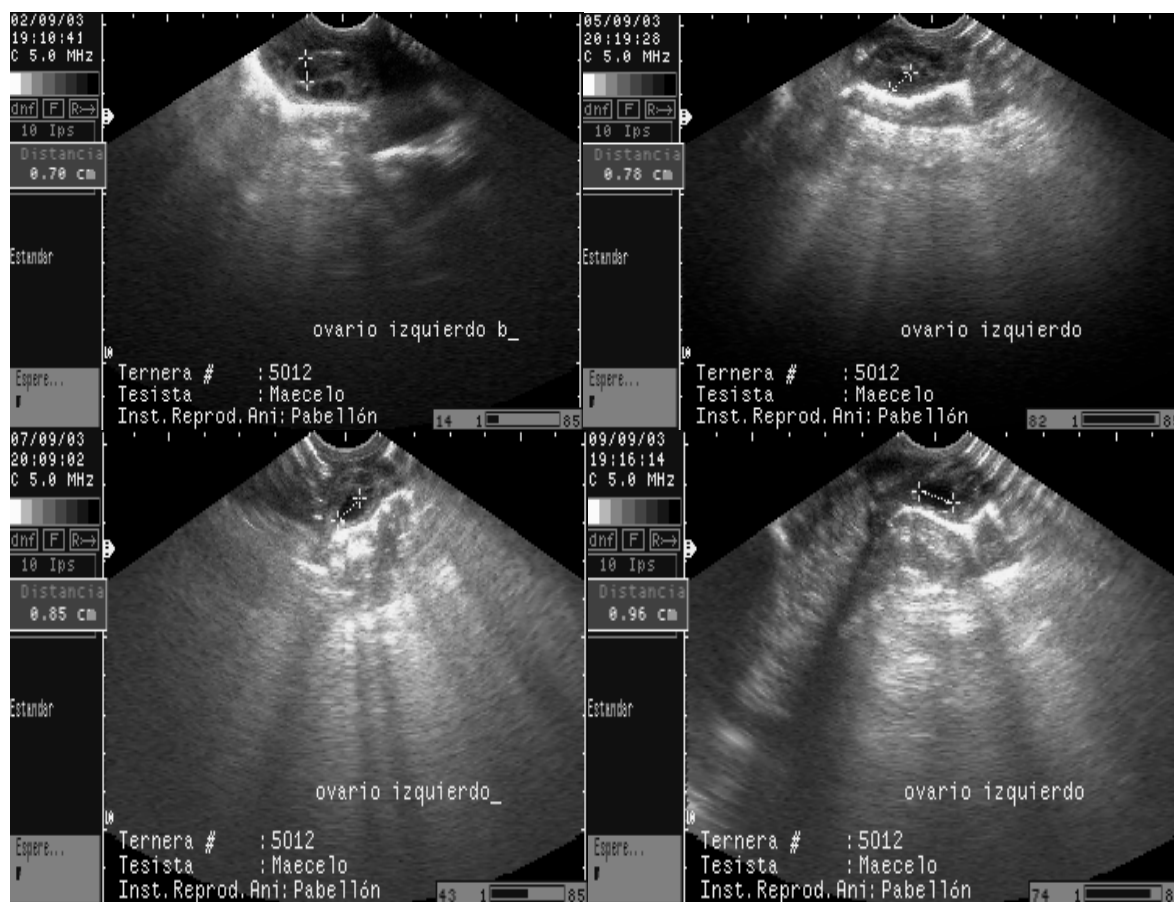


Figura 6: Crecimiento y dominio folicular en ternera 1012 (Ovario izquierdo)

En relación a la estimulación hormonal se observó una respuesta ovárica excelente tanto en cantidad y tamaño de los folículos a excepción de la ternera 5007 que no mostró respuesta al tratamiento. El resultado de los registros tanto antes del tratamiento y después del tratamiento se realizó en base a la cantidad y tamaño de los folículos visualizados (cuadro 2).

Cuadro 2: Registro en número y tamaño de folículos en terneras prepúberes antes y después del tratamiento con (eCG) 1.250 UI y (hCG) 1.000 UI.

	n	Fol. < a 3 mm X ± de (rango)	Fol. > a 3- 7 mm X ± de (rango)	Fol. > a 7 mm X ± de (rango)	Fol. Totales X ± de (rango)
Terneras Pre-Tratamiento	6	8,5 ± 2,81 (5-13)	1,16 ± 1,47 (0-4)	0,33 ± 0,51 (0-1) <sup>1</sup>	10 ± 2,28 (7-14)
Terneras Pos-Tratamiento	6	0	1 ± 2,45 (0-6) <sup>2</sup>	18 ± 10,14 (0-30) <sup>3</sup>	19 ± 8,1 (6-30)

1 Sólo en la ternera 5004 se registró 2 folículos mayores a 7 mm (Pre-tratamiento).

2 La ternera 5007 no reaccionó al tratamiento hormonal y presentó folículos medianos en menor número.

3 La respuesta muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) en comparación a antes del tratamiento.

En los registros gráficos realizados en cada ternera tanto antes como después del tratamiento hormonal podemos apreciar claramente las diferencias en población folicular (Figura 7).



Figura 7: Ovario izquierdo de ternera 5006 antes y después del tratamiento hormonal.



Las punciones foliculares se realizaron en todas las terneras aspirándose todos los folículos mayores a 3 mm. (Cuadro 3).

Cuadro 3: Total de folículos punzados, ovocitos recuperados y porcentaje de recuperación.

	<b>n</b>	<b>Folículos punzados</b>	<b>Ovocitos recuperados</b>	<b>% Recuperación</b>
<b>Terneras</b>	6	114	34	29,8

La población de ovocitos recuperados correspondió casi en su totalidad a ovocitos con cúmulos expandidos (85,2 %), lo que indica que el tratamiento hormonal estimuló la maduración *in vivo* de los ovocitos. A continuación se indica la clasificación según el estado de las células del cúmulo a la que se sometieron los ovocitos recuperados (Cuadro 4).

Cuadro 4: Clasificación ovocitos recuperados según estado células del cúmulo.

	<b>Total Ovocitos</b>	<b>Ovocitos clase 1 (cél. Cúmulo compactas)</b>	<b>Ovocitos clase 2 (cél. Cúmulo expandidas)</b>	<b>Ovocitos clase 3 (desnudos)</b>	<b>Ovocitos clase 4 (degenerados)</b>
<b>N°</b>	34	2	28	1	2
<b>%</b>	100	5,9	85,2	3	5,9

El estado de expansión de las células del cúmulo es un indicador de la maduración del ovocito y se puede apreciar tal característica en los ovocitos recuperados (Figura 8 y 9).

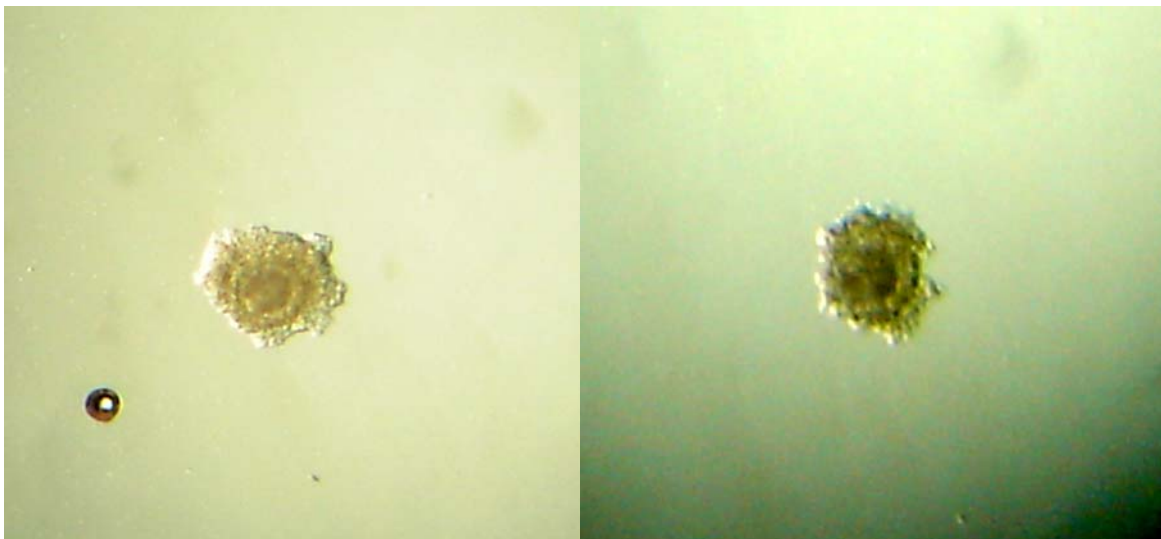


Figura 8: Ovocitos con células del cúmulus compactas.

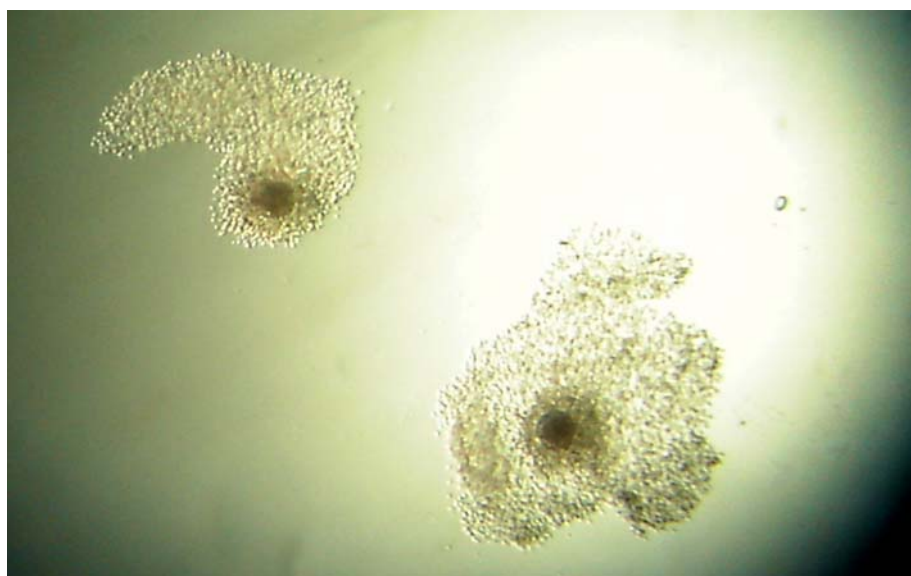


Figura 9: Ovocitos con células del cúmulus expandidas.

## 6. DISCUSIÓN.

La punción transvaginal guiada por ultrasonografía demostró ser una técnica adecuada y repetible para la obtención de ovocitos desde terneras prepúberes vivas, aplicable en nuestro medio con resultados de recuperación similares a los obtenidos por Brogliatti y col. (1995) Fry y col. (1998).

Los procesos de seguimiento folicular y punción folicular se realizaron sin problemas y la combinación de preanestesia 1 ml de Acepromazina maleato intramuscular más la anestesia epidural baja (Lidocaína 2%) en una dosis de 1 – 1,5 ml aplicada en el primer o segundo espacio intercoccígeo fueron adecuados para trabajar sin inconvenientes y en forma similar a lo realizado por Mogollón (2003) en bovinos adultos.

El período de acostumbramiento de las terneras a la palpación rectal fue relativamente corto y se realizó cuidando no dañar ninguna estructura y procurando no estresar mayormente los animales para el desarrollo adecuado de los trabajos posteriores.

El transductor ocupado resultó adecuado para el éxito del trabajo en animales de estas dimensiones, ya que se pudo introducir y manejar correctamente sin causar traumas en la vagina de las terneras y principalmente permitió una excelente visualización del ovario y sus estructuras.

El seguimiento folicular se realizó utilizando el ecógrafo modo – B en tiempo real obteniendo imágenes que lograron ilustrar el continuo y ordenado crecimiento de folículos, el predominio de uno o más sobre el resto, aumentando su tamaño sin llegar a ovular y regresionando luego para dar paso al crecimiento de nuevos folículos.

Estos resultados se asemejan a los estudios de ondas foliculares en bovinos adultos de Savio y col.(1988) y Ginther y col. (1989a) y lo reportado por Mogollón (2003) donde se describen de 1 a 4 ondas foliculares, siendo lo más común la presencia de 2 a 3 ondas (Savio y col., 1993). Lo más relevante es la similitud con descripciones de actividad folicular en terneras donde se describen ondas de crecimiento folicular (Evans y col., 1994); (Adams y col., 1994); (Brogliatti y col., 1996), con la excepción que en el presente trabajo los tiempos de aparición de nuevas ondas de crecimiento folicular no se pudieron establecer con precisión por el corto período de seguimiento.

El desarrollo de varios folículos mayores a 3 mm o reclutamiento de folículos observado en las terneras es homologable con los resultados expuestos por Evans y col. (1994) y Brogliatti y col. (1996) de estudio de dinámica folicular en terneras, donde el reclutamiento de folículos surge a consecuencia de un aumento transitorio en los niveles de FSH medible desde las primeras semanas de vida.

El predominio y continuo crecimiento en tamaño de un folículo por sobre los demás folículos reclutados, los cuales detienen su crecimiento y posteriormente se atresian, (dominancia), observado en este estudio es comparable a lo informado por Adams y col. (1993).

El tratamiento gonadotrófico utilizado para obtener crecimiento folicular múltiple y maduración *in vivo* de los ovocitos logró una respuesta adecuada en la gran mayoría de las terneras (5 de 6 mostraron respuesta) tanto en cantidad de folículos como en tamaño, comprobándose posteriormente también en el estado de los ovocitos recuperados (85 % de ovocitos expandidos). La respuesta de este tratamiento concuerda con tratamientos gonadotróficos realizados en terneras por Casida y col. (1943); Marden (1953); Onuma y col. (1969); Sciarreci (1984); Silva (1988); Herrera (2000).

La ternera (5007) que no mostró respuesta al tratamiento de crecimiento folicular múltiple se enmarca en los rangos esperables a tratamientos gonadotróficos aplicados a poblaciones bovinas como se refleja en los trabajos de Sciarreci (1984); Fry (1998).

En relación a la cuantificación de la respuesta a la estimulación gonadotrófica para el crecimiento folicular múltiple (Cuadro 2) se observa en las terneras postratamiento una población de folículos totales ( $X 19 \pm 8,1$  con rango 6-30) superior a lo registrado antes del tratamiento ( $X 10 \pm 2,3$  con rango de 7-14). También es posible apreciar en las terneras tratadas que la población de folículos observados corresponde en un 95 % a folículos mayores a 7mm con excepción de 6 folículos entre 3 a 7 mm encontrados en la ternera no reaccionante (5007).

La técnica de recuperación de ovocitos desde terneras prepúberes demostró ser aplicable, ya que se consiguió obtener ovocitos luego de un tratamiento gonadotrófico con una tasa de recuperación del 29,8 % (Cuadro 3) consiguiendo ovocitos en un estado de expansión que indicaría maduración *in vivo* de los mismos (85%).

En cuanto la tasa de recuperación fue de alrededor de 30%, se puede comparar a resultados obtenidos en trabajos similares en hembras bovinas adultas en los cuales los porcentajes de recuperación varían entre un 7% Scott y col. (1994) y un 69,6% de Looney y col. (1994); Mogollón (2003) obtuvo un 59,6% en su estudio realizado en la Universidad Austral de Chile. Resultados obtenidos por Fry (1998) en terneras de más de 6 meses de edad fueron de alrededor de 60% de recuperación. En comparación la tasa de recuperación obtenida puede considerarse baja y a esto debemos consignar las 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. Sin embargo estos resultados reflejan la aplicabilidad de la técnica y su necesario desarrollo.

En conclusión la técnica de aspiración folicular transvaginal por ultrasonografía en terneras prepúberes demuestra ser altamente repetible, poco invasiva y aplicable en nuestro medio como herramienta para la obtención de ovocitos viables de ser utilizados en programas de fecundación *in vitro* y transferencia de embriones, acortando el lapso intergeneracional y permitiendo la ejecución de prueba de progenie en hembras, entre otros beneficios.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

**ADAMS, G. P., K. KOT, C. SMITH, O. J. GINTHER.** 1993. Effect of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 73:267-275.

**ADAMS, G. P., A. C. O. EVANS, N. C. RAWLINGS.** 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil* 100:27-33.

**ARMSTRONG, D.T.** 1970. Reproduction. *Ann. Rev. Physiol.* 32: 439 – 470.

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

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

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

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

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

**BERIDIAN, K.N., R.D. BAKER.** 1975. Follicular development, oocyte maturation and ovulation in gonadotropin-treated prepubertal calves. *Can. J. Anim. Sci.* 55: 193 – 199.

**BONI, R., S. ROVIELLO, L. ZICARELLI.** 1996. Repeated ovum pick up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology.* 46:899-909.

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

**BROGLIATTI, G. M., A. T. PALASZ, G. P. ADAMS.** 1996. Ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration and oocyte collection in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 45: 249 Abstr.

**BUCCIONE, R., A.C. SCHROEDER, J.J. EPPIG.** 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43: 543-547.

**CALLESEN, H., T. GREVE, F. CHRISTENSEN.** 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27:217.

**CASIDA, L.E., R.K. MEYER, W.H. McSHAN, N. WISNICKY.** 1943. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 4: 76. Citado por ONUMA, H., J. HAHN, R.R. MAURER, R.H. FOOTE. 1969. Repeated superovulation in calves. *J. Anim. Sci.* 28: 634 – 637.

**CORREA, J.E., R. GATICA., J. COX., C. SCHULER.** 1979. Situación actual de la transferencia de embriones en bovinos en Valdivia. II Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Chile. 103.

**DEL CAMPO, H.C.** 1985. Perspectivas de las biotecnologías en la reproducción animal. X Jornadas Médico Veterinarias. Treinta años de Medicina Veterinaria. Presente y futuro. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. 13-44.

**DOMENECH, J.M. 1980.** Bioestadística. 3ª edición. Editorial Herder. Barcelona. España

**DUBY, R.T., J.M. ROBL.** 1987. Oocyte collection from gonadotropin-stimulated calves and their subsequent fertilization in vitro. *J. Anim. Sci.* 65 (Supple): 387 (Abstr.).

**EDMONDSON A.J., R.A. FISSORE, R.L. PASHEN, R.H. BONDURANT.** 1986. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 157 – 165.

**ERICKSON, B.H.** 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25: 800 - 805.

**EVANS, A. C. O., G.P. ADAMS, N. C. RAWLINGS.** 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* 102:463-470.

**FOOTE, R.H., H. OUMA.** 1970. Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A Review. *J. Dairy Sci.* 53: 1681-1692.

**FRY, R.C., T.L. SIMPSON, T.J. SQUIRES.** 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49:1077 – 1082.

**GINTHER, O. J., J. KASTELIC, L. KNOPF.** 1989a. Composition and characteristic of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20:187-200.

**GOUDET, G., J. BÉZARTG. DUCHAMP, E. PALMER.** 1997. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: An alternative to in vitro maturation in the mare? *Equine Vet. J.* 25:54-59.

**HAFEZ, E.S.E.** 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ta ed., Interamericana McGraw-hill, México.

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

**HOLLAND, E.J., B.M. BINDON, L.R. PIPER, J. THIMONIER, K.A. CORNISH, H.M. RADFORD.** 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and midventral routes. *Anim Reprod Sci.* 4:127-135.

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

**JAINUDEEN, M.R., E.S.E. HAFEZ, J.A. LINEWEAVER.** 1966. Superovulation in the calf. *J. Reprod. Fert.* 12:149–153.

**LAMBERT, R.D., C. BERNARD, J. E. RIOUX, R. BELAND, D. D'AMOURS, A. MONTREUIL.** 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology.* 20:149-161.



**LOONEY, C.R., B.R. LINDSEY, C.L. GONSETH, D.L. JOHNSON.** 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41:67-72.

**LOONEY, C.R., P. DAMIANI, B.R. LINDSEY, C.R. LONG, C.L. GONSETH, D.L. JOHNSON, R.T. DUBY.**1995. Use of prepuberal heifers as oocyte donors for IVF: Effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology*. 43:269 (Abstr.)

**LOUHI, M. M.** 1995. Potencial benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programmes. *Theriogenology*. 43:51-60.

**MARDEN, W.G.R.** 1953. The hormone control of ovulation in the calf. *J. Agric. Sci. Camb.* 43: 381. Citado por JAINUDEEN, M.R., E.S.E. HAFEZ, J.A. LINEWEAVER. 1966. Superovulation in the calf. *J. Reprod. Fert.* 12: 149 – 153.

**Mc DONALD, L.E.** 1981. Reproducción y endocrinología veterinaria. 2da ed., Interamericana, México.

**MELLIN, T.N., W.J. O'SHANY, R.D. BUSH.** 1975. Induction of follicular growth and ovulation in prepuberal heifers and ewes with synthetic gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology* 4: 41 – 58. Citado por SCIARRESI, I.A. 1984. Inducción de ovulación en terneras prepúberes. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

**MICKELSEN, W. D., R. W. WRIGHT Jr., A. R. MENINO, C. S. ZAMORO, L. G. PAISLEY.** 1978. Superovulation, fertilization and embryo recovery in gonadotropin treated prepuberal calves. *Theriogenology* 10: 167 – 174.

**MOGOLLÓN, G.F.** 2003. Efecto del tratamiento gonadotrópico 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, Valdivia, Chile.

**NARANJO, C., U. BUSTOS.** 1992. Métodos en farmacología clínica. Métodos de ensayos clínicos de medicamentos. Editorial OPS. Washington. Estados Unidos de América.

**NYLAND, T.G., J.S. MATTOON, E.R. WISNER.** 1995. Physical principles,

instrumentation, and safety of diagnostic ultrasound. Citado por: Nyland G.T. And J.S. Matton. Veterinary diagnostic ultrasound. D.W. Saunders company philadelphia. Phensylvania. USA.

**ONUMA, H., J. HAHN, R.R. MAURER, R.H. FOOTE.** 1969. Repeated superovulation in calves. *J. Anim. Sci.* 28:634 – 637.

**ONUMA, H., J. HAHN, R.H. FOOTE.** 1970. Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of superovulated ova in prepuberal cattle. *J.Reprod. Fert.* 21:119 – 126.

**PIERSON, R.A., O.J. GINTHER.** 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J. Am. Med. Vet. Assoc.* 190: 995 – 1001.

**PIERSON, R.A. Y O. J. GINTHER.** 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and the uterus and cattle. *Theriogenology.* 29: 21-37.

**REEVES J.J., N.W. RANTANEN, M. HAUSER.** 1984. Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. *Theriogenology* 21: 485 – 494.

**SAVIO, J.D., L. KEENAN, M. P. BOLAND, J. ROCHE.** 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83:663-671.

**SAVIO, J.D., W. W. THATCHER, L. BADINGA, R. L. DE LA SOTA, D. WOLFENSON.** 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil* 134:440-443.

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

**SCOTT, C. A., L. ROBERTSON, R. T. D. DE MOURA, C. PATERSON, J. S. BOYD.** 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.* 134:440-443.

**SIMON, L., L. WUNGARTZ, D. RATH, H. NIEMANN.** 1993. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology* 39:312 (Abstr.).

**SEIDEL, G.E., Jr. L.L. LARSON, R.H. FOOTE.** 1971. Effects of age and gonadotropin treatment on superovulation in the calf. *J. Anim. Sci.* 33: 617 – 622.

**SHERWOOD, O.D., W.H. Mc Shan.** 1977. Gonadotropins. In : *Reproduction in Domestic Animals*. Ed. por COLE, H.H., P.T. CUPPS. 3th Edition Academia Press. London, England.

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

**SORENSEN, A.M., W. HANSEL, W.H. HAUH, D.T. ARMSTRONG, K. McENTEE, R.W. BRATTON.** 1959. Causes and prevention of reproduction failures in dairy cattle. I. Influence of underfeeding and overfeeding on growth and development of Holstein heifers. *Cornell Agri. Exp. Sta. Bul.* 936, citado por, HOWE, G.R., R.C. FOLEY, D.L. BLACK, W.G. BLACK. 1964. Histological characteristics of the pituitary glands and reproductive tracts of normal and hormone treated prepuberal heifer calves. *J. Anim. Sci.* 23: 613 – 620.

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

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

**TERVIT, H. R.** 1995. Laparoscopy / laparatomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 42:227-238.

**TESTART, J.** 1972. Synchronisation des ovulations induites chez le veau femelle impubere. VII Internationaler kongress für tierische fortpflanzung, München. pp. 493 – 498.

## 8. ANEXOS.

Cuadro 5: Folículos observados antes del tratamiento gonadotrófico, promedio, varianza, desviación estándar y rango.

N° Ternera	Fol. De 0,5 a 3 mm	Fol. de 3,1 a 7 mm	Fol. > a 7 mm	Total Fol.
5004	6	0	1	7
5006	9	1	0	10
5007	13	1	0	14
5008	5	4	0	9
5010	9	0	1	10
5012	9	1	0	10
<b>Total</b>	51	7	2	60
<b>Promedio (X)</b>	8,5	1,16	0,33	10
<b>Varianza</b>	7,9	2,17	0,27	5,2
<b>Des. Estan.(d.s)</b>	2,81	1,47	0,51	2,28
<b>Rango</b>	(5-13)	(0-4)	(0-1)	(7-14)

Cuadro 6: Folículos observados después del tratamiento gonadotrófico, promedio, varianza, desviación estándar y rango.

N° Ternera	Fol. de 0,5 a 3 mm	Fol. de 3,1 a 7 mm	Fol. > a 7 mm	Total Fol.
5004	0	0	16	16
5006	0	0	22	22
5007	0	6	0	6
5008	0	0	17	17
5010	0	0	30	30
5012	0	0	23	23
<b>Total</b>	0	6	108	114
<b>Promedio (X)</b>	0	1	18	19
<b>Varianza</b>	0	6	102,8	65,6
<b>Des. Estan.(d.s)</b>	0	2,45	10,14	8,1
<b>Rango</b>	0	(0-6)	(0-30)	(6-30)

Cuadro 7: Determinación de diferencias significativas en terneras en observaciones del número de folículos según tamaño antes y después del tratamiento gonadotrófico según la prueba t de Student.

	<b>Fol. de 0,5 a 3 mm</b>	<b>Fol. de 3,1 a 7 mm</b>	<b>Fol. &gt; a 7 mm</b>
<b>Varian. combin.</b>	3,95	4,08	51,5
<b>Error estandar</b>	1,15	0,8	2,17
<b>t</b>	7,4	0,14	4,35

Cuadro 8: Total folículos punzados, ovocitos recuperados y porcentajes de recuperación.

<b>N° Ternera</b>	<b>Fol. Punzados</b>	<b>Ovoc. Recuperad.</b>	<b>% Recuperación</b>
<b>5004</b>	16	4	25
<b>5006</b>	22	6	27,27
<b>5007</b>	6	2	33,33
<b>5008</b>	17	8	47,05
<b>5010</b>	30	8	26,67
<b>5012</b>	23	6	26,08

## **9. AGRADECIMIENTOS.**

Con especial satisfacción quiero manifestar mis más sinceros agradecimientos a quienes apoyaron e hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Instituto de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile que permitió desarrollar mi tesis, conocer y valorar el mundo de la reproducción animal y permitió la preparación para mi futuro profesional.

A mi profesor patrocinante Dr. Jorge Correa Soto por su invaluable ayuda en el desarrollo del presente trabajo a través de sus conocimientos y sincero apoyo, por su paciencia y en especial por su amistad y valiosos consejos de vida.

A la Sra. Carmen V. Schüller por su colaboración en la implementación práctica de este trabajo, pero en especial por su alegría y amistad que sirvieron de guía, sobre todo en los momentos complicados.

A Guillermo Mogollón Blanco por su amistad y consejos y por su valiosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A los demás integrantes del instituto con especial referencia a la Dra. Claudia Letelier y el Dr. Mario Martínez por su apoyo y consejos.

A Rubén y Sergio por su cooperación y sincera ayuda.

A todos mis amigos que de alguna u otra forma me ayudaron a sacar esta tarea adelante siendo el complemento perfecto junto a mi familia para llenar mi vida de alegría, cariño y sincera amistad.