

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA MEDIANTE LA
ULTRASONOGRAFÍA CON EL TRANSDUCTOR
ENDOVAGINAL HUMANO, PARA LA COLECCIÓN DE
OVOCITOS EN VACAS BROWN SWISS EN ALTURA**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. LUDIO CAROL SANTI QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA MEDIANTE LA ULTRASONOGRAFÍA
CON EL TRANSDUCTOR ENDOVAGINAL HUMANO, PARA LA
COLECCIÓN DE OVOCITOS EN VACAS BROWN SWISS EN ALTURA”

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. LUDIO CAROL SANTI QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:

Dra. Martha Tapia Infantes

PRIMER MIEMBRO:

Mg. Sc. Rolando Daniel Rojas Espinoza

SEGUNDO MIEMBRO:

Mg. Sc. José Iván Quiñones García

DIRECTOR / ASESOR:

Dr. Manuel Guido Pérez Durand

Área : Reproducción animal

Tema : Aspiración folicular para la colección de ovocitos en vacas Brown Swiss

Fecha de sustentación: 28 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

A mi madre Ceferina, el estar a tu lado es una de las mayores muestras del amor de Dios hacia mi vida, te amo y no va haber manera de devolverte tanto que me has ofrecido, mi eterna gratitud por el constante apoyo mamá.

“Dios te bendiga amada madre mía”

A mis hermanos Aldo y Rudy, por los buenos momentos que pasamos, las ocurrencias que creamos juntos, gracias por sacarme una sonrisa en los momentos necesarios.

“Dios me los bendiga”

Al nuevo ser que por el momento no entiende mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que te des cuenta de lo que significas para mí, eres mi principal motivación

“DBS”

A mi padre Buenaventura, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por buscar siempre lo mejor para mí, por eso y muchas cosas más le agradezco a Dios el tenerte a mi lado.

“Gracias por todo papá”

A la persona maravillosa que Dios puso en mi camino, por el apoyo constante, por estar conmigo incluso en los momentos más turbulentos y el aliento para seguir adelante.

“Gracias Esther”

AGRADECIMIENTO

- ❖ A la Universidad Nacional del Altiplano por ser el alma mater para mi formación profesional.
- ❖ A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a los docentes que me impartieron sus enseñanzas y conocimientos para alcanzar mi formación como profesional.
- ❖ Al CIP-Chuquibambilla siendo Director, Dr. Rolando Rojas Espinosa, mi gratitud por haberme brindado las condiciones necesarias para la ejecución de la presente tesis.
- ❖ Mi eterno agradecimiento, admiración y respeto al Dr. Manuel Guido Pérez Durand, por su acertada dirección, desde el inicio de mi proyecto hasta la culminación de la presente tesis, por los conocimientos impartidos, por los buenos momentos académicos y por ser un gran maestro.
- ❖ A mis jurados de tesis Dra. Marta Nancy Tapia Infantes, Mg. Sc. Rolando Daniel Rojas Espinoza y Mg. Sc. José Iván Quiñones García, por la orientación y paciencia que tuvieron.
- ❖ Al Dr. Harold Pérez Guerra por la orientación para la conclusión de mi tesis
- ❖ A mis amigos de laboratorio Darwin, Madeleyne y Edita, hoy doctores, por el compañerismo compartido, por los momentos divertidos que pasamos juntos.
- ❖ A mi amiga Lisbeth (Bellatrix) por siempre estar presente para echarme una mano, a Arnaldo por el apoyo mutuo brindado en el CIP Chuquibambilla.
- ❖ A Mary Esther, por echarme las ganas para seguir adelante y el apoyo incondicional demostrado.

(Ludio Saint)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
1.1.1 Objetivo general	13
1.1.2 Objetivos específicos	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1. ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA VACA ..	14
2.1.1 Vulva	14
2.1.2 Vagina	14
2.1.3 Cérvix	14
2.1.4 Útero	15
2.1.5 Oviducto	15
2.1.6 Ovarios.....	15
2.2. OVOGÉNESIS.....	16
2.3. FOLICULOGÉNESIS.....	17
2.4 DINAMICA FOLICULAR.....	18
2.4.1 Reclutamiento folicular	19
2.4.2 Selección folicular	19
2.4.3 Dominancia	20
2.4.4 Atresia	20
2.5 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO FOLICULAR	21
2.6 LA ULTRASONOGRAFÍA	22
2.6.1 Transductores	23
2.6.2 Transductor endovaginal humano	25
2.6.3 Examen ecográfico de los ovarios.....	26
2.7 TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASONOGRAFIA (OPU)	26
2.8 PROCEDIMIENTOS PARA LA ASPIRACIÓN FOLICULAR OPU	27
2.8.1 Preparación de la donadora	27
2.8.2 Aspiración folicular	28
2.8.3 Filtrado	29
2.8.4 Clasificación de ovocitos	29

2.9 USO Y ASPIRACIÓN DE LOS FOLÍCULOS POR OPU	30
2.10 ANTECEDENTES DE ASPIRACIÓN FOLICULAR	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 LUGAR.....	35
3.2 ANIMALES.....	35
3.3 MATERIALES UTILIZADOS PARA LA ADECUACIÓN DEL ASPIRADOR FOLICULAR	35
3.4 METODOLOGÍA	36
3.4.1 Preparación de los animales	36
3.4.2 Aspiración folicular	36
3.4.3 Solución para aspiración	37
3.4.4 Evaluación de los ovocitos	38
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. ADECUACIÓN DE UN ASPIRADOR FOLICULAR	40
4.1.1 Transductor	40
4.1.2 Mango para aspiración.....	41
4.1.3 Guiador para la aguja de aspiración.....	42
4.1.4 Guía de aguja y línea de aspiración	44
4.1.5 Tubo colector y tapón de vacío	45
4.1.6 Bomba de aspiración.....	45
4.1.7 Agujas de aspiración	46
4.2 CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS	47
4.2.1 Porcentaje de folículos según tamaño (mm)	47
4.2.2 Recuperación de ovocitos.	49
4.2.3 Ovocitos obtenidos según clasificación.....	51
V. CONCLUSIONES.....	54
VI. RECOMENDACIONES	55
VII. REFERENCIAS.....	56
ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de transductores (Hofer, 2006)	23
Figura 2. Transductor endovaginal de uso humano.....	41
Figura 3. (a) Campo ultrasónico de 90° y (b) campo ultrasónico >90° adecuado hacia la aguja (Bols et al. 1994)	41
Figura 4. Transductor montado sobre el mango de aspiración.....	42
Figura 5. Tubo de aluminio (guiador).....	43
Figura 6. Guiador montado sobre el transductor.....	43
Figura 7. Guía de aguja y línea de aspiración	44
Figura 8. Tubo colector y tapón de vacío	45
Figura 9. Bomba de vacío para aspiración	46
Figura 10. Agujas de aspiración.....	46
Figura 11. Distribución porcentual de folículos según tamaño (mm)	47
Figura 12. Materiales utilizados para la adecuación de un equipo de aspiración	70
Figura 13. Armado completo de un equipo de aspiración folicular	70
Figura 14. Ingreso al brete, desinfección de toda la zona perianal y vulva, colocación anestesia epidural.....	71
Figura 15. Aspirador con funda de plástico.....	71
Figura 16. Introducción del aspirador folicular	72
Figura 17. Ubicación y medición de folículos.....	72
Figura 18. Introducción de la aguja de aspiración por el tubo guiador.....	73
Figura 19. Líquido aspirado	73
Figura 20. Filtrado y lavado de los ovocitos	74
Figura 21. Clasificación de ovocitos.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de tamaño folicular en general (4 vacas).....	48
Tabla 2. Ovocitos recuperados por punción.....	49
Tabla 3. Número de ovocitos obtenidos según categoría.....	51
Tabla 4. Datos generales de conteo de folículos y n° de ovocitos recuperados por punciones.....	68
Tabla 5. Número y porcentaje de folículos visualizados según tamaño (mm)	69

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

PBS	Solución Buffer Fosfato.
SFB	Suero Fetal Bovino.
PIVE	Producción <i>in vitro</i> de embriones
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
μL	Microlitro.
mL	Mililitro.
COCs	Complejo cúmulos ovocitos.
UI	Unidad internacional.
mm	Milímetro.
Cm	Centímetro.
°C	Grados centígrados.
FF	Fluido folicular.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el CIP Chuquibambilla de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, siendo el objetivo de realizar la aspiración folicular guiada por ultrasonografía en vacas Brown Swiss, adecuando un transductor endovaginal humano, para la obtención y posterior clasificación de los ovocitos; para lo cual se emplearon 4 vacas secas entre 8 a 10 años de edad, alimentadas solo al pastoreo, las vacas antes de la aspiración folicular fueron sometidas a un flujo de manejo (limpieza, anestesia, ingreso y salida del brete). Para el proceso de aspiración folicular se utilizó un transductor endovaginal humano que fue adecuado con diversas piezas necesarias para asemejar a un aspirador convencional, realizando un total de 24 sesiones de aspiración folicular (6 repeticiones por vaca) semanalmente. Se evaluó el tamaño folicular siendo 54.3% para folículos < 5mm, 37.0 % para ≥ 5 a <10 mm y 8.7% para \geq a 10mm. La tasa de recuperación general fue de 19.4% de la cual el 21.4% fueron de categoría A; 21.4% de categoría B; 14.3% categoría C y 42.9% categoría D, los valores encontrados fueron sometidos a la prueba de Chi-cuadrado mediante el programa estadístico R 3.4.4., donde existe dependencia entre la obtención de ovocitos según categoría respecto a vacas ($p < 0.05$). En conclusión el uso del transductor endovaginal humano acondicionado como aspirador folicular, permite la recuperación de los ovocitos, obteniéndose una mayor cantidad de ovocitos categoría D.

Palabras Clave: vacas, equipos de aspiración, aspiración folicular, ovocito.

ABSTRACT

The present research work was carried out in the CIP Chuquibambilla of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of the Altiplano, with the objective of performing follicular aspiration guided by ultrasound in Brown Swiss cows, adapting a human endovaginal transducer, for the obtaining and later classification of the oocytes; for which 4 dry cows between 8 to 10 years of age were used, fed only to grazing, the cows before the follicular aspiration were subjected to a management flow (cleaning, anesthesia, entry and exit of brete). For the follicular aspiration process, a human endovaginal transducer was used, which was adequate with various parts necessary to resemble a conventional aspirator, making a total of 24 sessions of follicular aspiration (6 repetitions per cow) weekly. The follicular size was evaluated being 54.3% for follicles <5mm, 37.0% for ≥ 5 to <10 mm and 8.7% for \geq to 10mm. The overall recovery rate was 19.4% of which 21.4% were category A; 21.4% of category B; 14.3% category C and 42.9% category D, the values found were subjected to the Chi-square test using the statistical program R 3.4.4., Where there is dependence between obtaining oocytes according to category with respect to cows ($p < 0.05$). In conclusion, the use of the human endovaginal transducer conditioned as a follicular aspirator allows the recovery of the oocytes, obtaining a greater quantity of category D oocytes.

Keywords: cows, aspiration equipment, follicular aspiration, oocyte.

I. INTRODUCCIÓN

En el Departamento de Puno la crianza de vacunos es una de las actividades más importantes, con una población de 617 163 vacunos, del cual un 36.4% son de raza Brown Swiss (INEI, 2013).

En los últimos años, se han introducido nuevas técnicas asistidas en reproducción bovina como la producción *in vitro* de embriones (PIV) y la fertilización *in vitro* (FIV), siendo necesario la obtención de ovocitos de buena calidad. La producción *in vitro* de embriones junto con la técnica de obtención de ovocitos por aspiración folicular guiada por ultrasonografía, conocida mundialmente como OPU, son biotecnologías reproductivas que han tenido un avance significativo en los últimos 10 años (Stroud, 2011).

La aspiración folicular es una técnica para la obtención de ovocitos de vacas vivas, que puede ser utilizada en aquellos animales que presenten problemas reproductivos, (oviductos obstruidos, metritis persistente, etc.) animales viejos, refractarios a los tratamientos superovulatorios, así como de animales saludables genéticamente valiosas que se encuentren vacías, gestantes (primer trimestre) o en el período pospartal temprano (60 días). Puede incluso obtenerse ovocitos de hembras prepúberes, lo cual disminuye considerablemente el intervalo generacional (Murphy y Pescador 1996).

La obtención de ovocitos mediante aspiración folicular transvaginal seguida por la producción *in vitro* de embriones (PIVE), ha sido considerada como una técnica alternativa promisorio frente a la superovulación y la transferencia de embriones y constituye en la base para el desarrollo de nuevas tecnologías (Cran and Johnson, 1996; Vivanco, 2002).

Una adecuación se establece conforme al ángulo de ultrasonografía que tenga un transductor y el sistema de agujas que se emplea (Bols et al., 1994). La mayoría de autores describen el uso de transductores de tipo micro-convexo (Seneda et al., 2003)

Scott et al. (1994) Describieron el uso de diferentes tipos de escáneres y desarrollaron un nuevo sistema para la aspiración folicular, siendo la técnica OPU óptima para la colección de ovocitos, pero el adquirir un equipo OPU demanda un alto costo, frente a este problema el presente trabajo busca una alternativa del uso de un transductor endovaginal humano, adecuándolo en un sistema de aspiración folicular transvaginal, el cual posteriormente aportara a más investigaciones relacionadas a la técnica OPU.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1 Objetivo general

- Adecuar un aspirador folicular guiado por ultrasonografía utilizando un transductor endovaginal humano para luego cuantificar y clasificar los ovocitos recuperados por el uso del mismo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Adecuar un aspirador folicular guiado por ultrasonografía utilizando un transductor endovaginal humano.
- Cuantificar y clasificar los ovocitos recuperados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA VACA

2.1.1 Vulva

Se considera la parte externa expuesta del aparato reproductor de la hembra, sus funciones más importantes son, que sirve como superficie de contacto al momento de la copula, y la salida del feto durante el parto; se consideraran como parte de sus componentes anatómicos la estructura vulvar, los Labios mayores y el Clítoris (Sorensen, 1991).

2.1.2 Vagina

Se encuentra entre el vestíbulo vaginal y la cérvix, mide aproximadamente 25 a 30 centímetros; tiene gran importancia ya que sirve como receptáculo del semen depositado por el toro en el proceso de monta natural y como canal para la salida del feto durante el parto (Sorensen, 1991).

2.1.3 Cérvix

Es la parte más caudal del útero, mide de 8 a 10 centímetros de largo, sus funciones son las de servir como reservorio de semen, ayudar en el transporte del semen hacia el útero y servir como barrera entre el exterior y el útero (Manrique, 1990).

2.1.4 Útero

El útero de la vaca es bicornual, teniendo un cuerpo (útero) de 4 a 6 cm, el cual se divide en dos (cuernos uterinos) derecha e izquierda. Sirve como sitio de transporte para los espermatozoides hacia el sitio de fecundación, regula la vida del cuerpo lúteo a través de la producción de prostaglandina, ayuda en la expulsión del feto al momento del parto y de las membranas fetales (Galina y Valencia, 2008).

2.1.5 Oviducto

Los oviductos son las estructura que unen los cuernos uterinos y los ovarios, siendo responsable por el transporte del ovulo después de la ovulación y por servir como reservorio de espermatozoides hasta la fecundación. Desde el punto de vista fisiológico los oviductos están divididos en tres partes: El Infundíbulo, atrapa el ovulo después de la ovulación, El Ámpula, lugar donde se da la fecundación y el Itsmo, donde el embrión viaja después de la fecundación para llegar al cuerno uterino, también funciona como reservorio de semen (Sorensen, 1991).

2.1.6 Ovarios

Los ovarios en la vaca son los órganos principales del aparato reproductor de la hembra, de 1,5-5 cm. de largo y 1-3 cm. de ancho está constituido por medula y corteza (Galina y Valencia, 2008). El peso es de 15 a 20 g., en bovinos y ovinos los ovarios tienen forma de almendra (Sisson et al., 2005).

La función endocrina es producir hormonas, como estrógenos; necesarias para acondicionar el aparato reproductor para la recepción

del macho y para la fecundación del ovulo; son capaces de desarrollar el corpus luteum (cuerpo lúteo) que secreta la hormona progesterona, responsable de preparar el endometrio para la implantación del cigoto (Squires, 2003). Los dos ovarios son independientes y funcionan individualmente (Quintela et al., 2006).

En la superficie del Ovario se pueden encontrar dos estructuras diferentes: Folículos y cuerpo lúteo, los Folículos son llenos de fluidos, que contienen los óvulos en desarrollo, se pueden encontrar varios folículos en cada ovario, que varían en tamaño desde apenas visibles, hasta 20 mm en diámetro; La otra estructura que se encuentra en la superficie del ovario es el cuerpo lúteo (CL), que crece sobre el sitio de la ovulación del celo anterior, con el característico cuello y pedúnculo (Mellisho, 2011).

2.2 OVOGÉNESIS

Durante el tercio medio de la gestación el ovario del feto bovino se encuentra saturado de ovogonias que luego se convierten en ovocitos que son almacenados en folículos primordiales preantrales. Gran parte de esos ovocitos se inactivan durante la última mitad de la vida fetal naciendo así el animal con un único número de ovocitos encapsulado en su respectivo folículo. Existen cerca de 0.5 millones de folículos en los ovarios bovinos que gradualmente abandonaran su estado de latencia e iniciaran su desarrollo hacia folículos antrales (Murugavel, 2003).

Los ovocitos presentes en el ovario se originan a partir de un número de células germinales primordiales (CGP) que derivan del endodermo del embrión

en desarrollo; posteriormente emigran hasta el mesenterio y se exteriorizan en las crestas genitales. Una vez establecidas en el ovario primordial, estas células pierden su motilidad y son transformadas en ovogonias, las cuales comienzan a dividirse por sucesivas mitosis, hasta que la última generación de ovogonias entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios (Mattioli et al., 1994).

En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. Los ovocitos bovinos crecen desde un diámetro de 30 μm (sin incluir zona pelucida) en estadíos tempranos de crecimiento hasta un diámetro aproximado de 120-125 μm (Lucy et al., 1992).

2.3. FOLICULOGÉNESIS

Los ovocitos de todas las hembras de mamíferos se forman durante el desarrollo fetal, estos se encuentran alojados en el interior de los folículos primordiales (de cientos a miles) y abastecerán las necesidades de toda la vida reproductiva del animal (Moore et al., 1990). En bovinos de un máximo de 2.700.000 folículos primordiales, disminuye en un 90% durante las divisiones meióticas iniciales, quedando al nacimiento un número aproximado de 135.000 folículos primordiales (Van Den Hurk and Zhao, 2005). A lo largo del ciclo estral ocurren etapas sucesivas de crecimiento y regresión de folículos antrales, que conducen al desarrollo de los folículos preovulatorios, constituyendo lo que denominamos dinámica folicular (Lucy et al., 1992).

Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito en crecimiento, rodeado por un número específico de especie de células planas pre-granulosas (Picton, 2001), que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y el crecimiento del ovocito. Al adquirir la zona pelucida se conoce como folículo preantral

primario, donde las células pre-granulosas no ejercen ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento del ovocito pero sí sobre la meiosis (Moore et al., 1990). En este estadio, comienzan las mitosis de éstas células y al mismo tiempo el ovocito aumenta de tamaño. De este modo, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar (folículo secundario) que implica la transformación de células pre-granulosas que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de la granulosa. Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH, se forman cavidades en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular, a medida que la cantidad de líquido folicular aumenta, las cavidades también aumentan de tamaño formando la cavidad antral, denominándose folículo antral (folículo terciario). Tras esto, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten la pared del folículo, formando un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal y por otra las células del cumulus oophorus que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari, 1994).

2.4 DINÁMICA FOLICULAR

El desarrollo folicular en el ovario del ganado bovino es una asociación dinámica de eventos organizados bajo control hormonal, creando ondas foliculares, la cual es definida con el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos de 4 a 5 mm de diámetro, pasando por diversas fases de reclutación, selección y dominancia por parte del folículo dominante (DF) y la consecuente regresión de los folículos subordinados (Murugavel, 2003).

2.4.1 Reclutamiento folicular

El reclutamiento se refiere a una oleada de desarrollo folicular caracterizado por la dependencia absoluta a la influencia de las gonadotropinas especialmente a la FSH, y al diámetro de los folículos es de 4-5 mm., del grupo grande de folículos que inician su desarrollo solamente un pequeño porcentaje logra su potencial completo (endocrino y gameto génico), a lo que se denomina proceso de selección y crecimiento folicular (Adams, 1999).

El reclutamiento es un proceso por lo que, bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos (2-3 mm de diámetro) comienza a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación. La dominancia es el medio por el cual el folículo seleccionado inhibe el reclutamiento de una nueva serie de folículos (Fernández, 2003).

2.4.2 Selección folicular

La selección de un folículo dominante se refiere al mecanismo que determina cual folículo de la cohorte es seleccionado para continuar creciendo y convertirse en dominante. El principal evento morfológico en el proceso de selección es la divergencia. La divergencia corresponde al tiempo durante el cual el folículo dominante y el subordinado más desarrollado crecen a tasas diferentes, antes que el subordinado manifieste atresia (Sunderland et al., 1996).

2.4.3 Dominancia

Es el proceso por el cual el folículo seleccionado ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos, para el establecimiento de esta dominancia se requiere que se presente divergencia o desviación, que corresponde al tiempo en el cual el folículo dominante y subordinado más desarrollados crecen en una tasa diferente, antes de que el subordinado manifieste atresia (Montaño y Ruiz, 2005).

El folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás (diámetro mayor de 10 mm) y es responsable de la secreción de estradiol. Esta actividad estrogénica está relacionada con el incremento en la expresión de genes para aromatasa (P450 arom y P450 17 hidroxilasa), y receptor de FSH, así como la adquisición de receptores para LH en las células de la granulosa (Menduri et al., 2008).

2.4.4 Atresia

La gran mayoría de folículos presentes al nacimiento degeneran a través del proceso conocido como atresia o clausura u obliteración de un orificio o conducto del cuerpo, la cual ha sido descrita para diversas especies mamíferas (Huanca, 2001). La fase de atresia, consiste en la desaparición de los folículos que no son seleccionados como dominante o del folículo dominante el cual no llega a ser ovulatorio (cuando la lisis del cuerpo lúteo no coincide con la dominancia folicular) (Menduri et al., 2008).

Cuando los folículos sufren atresia cesa la síntesis de estradiol y las concentraciones de progesterona intrafolicular aumentan. Igualmente durante el proceso, se destacan algunos cambios morfológicos e histológicos, como son: núcleos picnoticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intercelular, desprendimiento del complejo cúmulos- ovocito (Sharma, 2000).

2.5 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO FOLICULAR

Existen factores que, aunque son independientes de la función ovárica, pueden llegar a alterar de manera directa su normal funcionamiento. Así, La nutrición desempeña un papel importante en la reproducción; así la restricción nutricional actúa tanto a nivel ovárico como del eje hipotalámico-hipofisiario, disminuyendo la tasa de crecimiento del folículo dominante (Gwazdauskas et al., 2000).

Las vacas con severo estrés nutricional fallan en la ovulación del primer folículo dominante, posiblemente debido a que la frecuencia en el pulso de LH es reducida para estimular la suficiente secreción de estrógenos por parte del folículo dominante e inducir el pico preovulatorio de LH (Mackey et al., 2000).

La condición corporal (CC) es un factor que se puede ver afectado, ya sea por condiciones en el periodo, ya sea posparto, lactancia, estrés calórico (descenso en ingesta de alimento), nutricionales, patológicas, etc. Se establece que el 80% de las vacas en lactancias tempranas tienen un balance de energía negativo; pierden peso, disminuyen la producción láctea y deprimen la función reproductiva, se puede afirmar que el balance de energía está directamente

relacionado con la CC, y esta, a su vez, con el número de folículos pequeños presentes en el ovario, siendo mayor en número en vacas con CC entre 3 y 5 (Gwazdauskas et al., 2000).

Las vacas que mantienen el peso y la condición corporal presentan mayor concentración de LH basal y gran liberación de LH inducida por la GnRH comparadas con aquellas con menor condición corporal (Mackey et al., 2000). Por tanto, la inducción de receptores de LH en las células de la granulosa determinan la selección de un folículo dominante como, también provocara la ovulación (Beg and Guither, 2006).

La frecuencia alta de los pulsos de LH es necesaria para mantener la dominancia durante la onda folicular, mientras que una frecuencia reducida, pero de mayor amplitud, marca la pérdida de la dominancia (Perera-Marin et al., 2005).

2.6 LA ULTRASONOGRAFÍA

La ultrasonografía utiliza ondas de sonido de alta frecuencia que producen imágenes de los tejidos y órganos internos (Giraldo, 2013). El principio de funcionamiento consiste en una corriente eléctrica que llega al transductor, donde produce una vibración en sus cristales; éstos emiten ondas sonoras que llegan a los órganos en estudio. Los tejidos tienen la capacidad de reflejar las ondas de sonido, y el eco resultante es recibido por el transductor, que lo convierte nuevamente en corriente eléctrica. Dentro del equipo la misma es decodificada y transformada en imágenes bidimensionales en tonos grises, blanco y negro (Rosell et al., 2008).

2.6.1 Transductores

Un transductor o sonda emite ondas de sonido de baja intensidad y frecuencia elevada hacia los tejidos donde interaccionan con las interfases de los mismos. Las ondas que se reflejan de vuelta al transductor, son enviadas a través de la sonda al ecógrafo en donde son analizadas y convertidas en una imagen en una escala de grises. Los transductores se pueden presentar de tres forma: lineales, convexos o sectoriales (Fig. 1) (Giraldo, 2003).

En veterinaria los Transductores más usados son de: 3.5-5 y 7.5 MHz (Quíntelas, 2006). Cuanto mayor es la frecuencia del sonido del transductor, la imagen producida es más precisa y se ven estructuras más pequeñas (foliculos de 2 mm). Cuanto menor es la frecuencia, permite ver estructuras mayores como gestaciones avanzadas (Hofer, 2006)

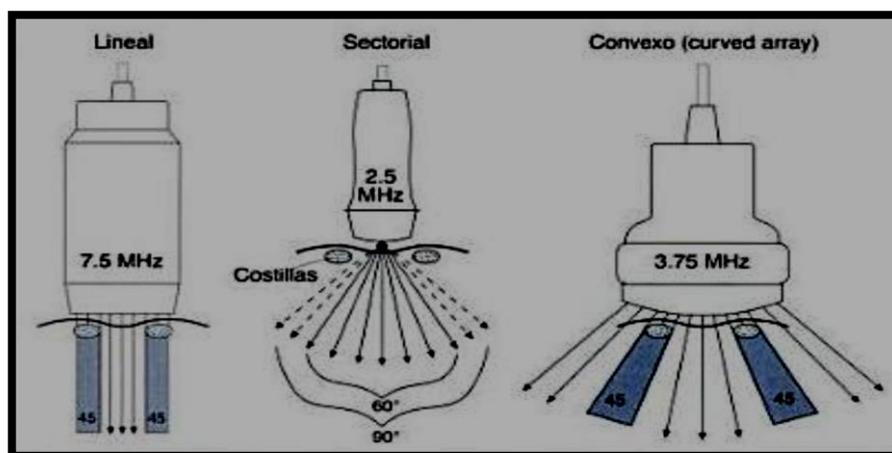


Figura 1. Tipos de transductores (Hofer, 2006)

2.6.1.1 Lineales

Los cristales pizoeléctricos están alineados a lo largo de su superficie. Esta disposición permite que las ondas emitidas viajen de forma paralela y en línea recta. La imagen obtenida es rectangular (Hofer, 2006).

2.6.1.2 Convexos

Tienen una superficie convexa. Sus cristales están dispuestos sobre la superficie convexa por lo que la imagen obtenida con estos transductores es en forma de abanico semi-abierto. Fueron diseñados para facilitar la obtención de ovocitos a través de punciones foliculares intraováricas, ablación de quistes foliculares y folículos dominantes. El diseño de estos transductores es diferente al de los lineales; cuentan con un mango de 50 a 60 cm de largo que permite una mejor manipulación para el diagnóstico transvaginal (Rosell et al., 2008).

2.6.1.3 Sectoriales

También llamados de sector tienen una superficie semicircular y sus cristales piezoeléctricos están organizados de esa forma. Las imágenes obtenidas son en forma de abanico completamente abierto (Rosell et al., 2008).

Para trabajos de recuperación de ovocitos (OPU) por punción ovárica o aspiración folicular, las más adecuadas son las micro-conexas de 5 o 7.5 MHz (Goddard, 2000). Para describir la textura de los tejidos en una imagen ecográfica existe una terminología

específica ecogénico o ecoico significa que la mayor parte del sonido se refleja hacia el transductor y estas áreas aparecen de color blanco en la pantalla (huesos, órganos). Anecoico se emplea para describir el tejido que transmite todo el sonido hacia tejidos más profundos, no reflejando ningún sonido hacia el transductor observándose de color negro (líquidos) (Rosell et al., 2008).

2.6.2 Transductor endovaginal humano

Es un transductor de alta densidad, con un mango recto, de 120 grados de campo de vista, necesitando menos movimiento del transductor para un examen más amigable del paciente (Clark, 2002). Su utilización se conoce como ultrasonografía endovaginal o transvaginal o pélvica, que permite una rápida visualización de los órganos y las estructuras pélvicas femeninas, que incluyen el útero, el cuello uterino, la vagina, las trompas de Falopio y los ovarios (Goldstein, 1992).

La ultrasonografía endovaginal se puede utilizar para diagnosticar y asistir el tratamiento de las siguientes afecciones: Anomalías en la estructura anatómica del útero, incluidas las afecciones endometriales, presencia y posición de un dispositivo intrauterino (DIU) anticonceptivo, control del tamaño del folículo ovárico para evaluar la infertilidad, aspiración del líquido del folículo y de los óvulos de los ovarios para realizar una fertilización in vitro, embarazo ectópico, entre otros (Frederick et al ., 1991).

2.6.3 Examen ecográfico de los ovarios

El examen de los ovarios se realiza en forma similar a la exploración rectal, realizando un barrido de la zona hasta localizar los ovarios, donde las estructuras fisiológicas detectables en el ovario mediante ecografía son los folículos y el cuerpo lúteo. (Quíntelas, 2006).

Los Folículos son visibles como cavidades negras o anecogénicas, con un borde muy fino, a veces de contorno irregular por la compresión de otras estructuras del ovario, su tamaño va creciendo durante el ciclo estral, llegando el folículo dominante a 15-20 mm previo a la ovulación; mientras que el cuerpo lúteo (CL) se aprecia de forma circular con una protuberancia, más o menos prominente sobre la superficie del ovario, de un tono gris oscuro, en su interior se puede apreciar una pequeña cavidad con líquido (Bellenda, 2002).

2.7 TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA (OPU)

La técnica de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía para la recuperación de óvulos, denominada OPU (Ovum pick-up), comenzó a utilizarse en la mujer en la década de 1980 y se describe por primera vez en bovinos por Pieterse et al. (1988). A finales de los años 1990 abre nuevos horizontes en el campo de las biotecnologías de la reproducción. Actualmente se utiliza en la mayoría de los centros dedicados a la producción de embriones *in vitro* (Hasler et al., 1995; Ward et al., 2000; Petyim et al., 2003).

La técnica de OPU consiste en la recolección de ovocitos (con ayuda de una aguja introducida por la vagina) mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo en hembras vivas (Pieterse et al., 1988; Denis et al., 2000; Bage et al., 2003). La técnica se realiza introduciendo el transductor por la vagina, manipulando desde el exterior de la vaca, mientras que la otra mano es introducida por el recto para fijar el ovario hacia la cabeza del transductor visualizándose el ovario y los folículos en la imagen ecográfica, una vez fijado el ovario, con movimientos suaves y cuidadosos se atraviesa la pared vaginal con la aguja, puncionando los folículos, cuyo contenido es aspirado por la bomba de vacío y recolectado (Corredor and Páez, 2012).

2.8 PROCEDIMIENTOS PARA LA ASPIRACIÓN FOLICULAR OPU

2.8.1 Preparación de la donadora

Se inicia ingresando la vaca al brete, luego la aplicación de anestesia epidural (clorhidrato de lidocaina al 2%) 5 mL (Kruip et al., 1994), otros profesionales prefieren sedar las hembras con hidrocloreuro de detomidina (Domocedan) vía endovenosa, a una dosis de 1 mg/100 kg de peso vivo, de igual forma utilizan (Buscopan) hyoscine-N-butylbromide utilizado como relajante intestinal antes de aplicar la anestesia epidural, a continuación se extraen las heces contenidas en el recto y una desinfección respectiva de la vulva y toda la región perineal (Bols, 1997).

2.8.2 Aspiración folicular

La aspiración se realiza con un equipo de ultrasonido, con un transductor micro-convexo de 5 – 7.5 MHz, acoplado a un mango de aspiración, el cual es introducido por la vagina y con ayuda de la otra mano del operador introducida por el recto, se procede a la localización y acercamiento del ovario al transductor, una vez seleccionado y ubicado el folículo mediante el ecógrafo, se procede a la punción haciendo coincidir estos con la línea discontinua que aparece en la pantalla del ecógrafo (previa activación del menú punción), posteriormente se inicia la presión negativa, visualizando la aspiración al desaparecer de la pantalla la imagen del folículo (Bols, 1997).

La punción de los folículos puede realizarse con diferentes tipos de agujas, largas o cortas, generalmente de 18 G, acompañada de una línea de aspiración (tubo de silicona), conectada a tubos de centrifuga de 50 mL (Fry et al., 1994). Con una presión de aspiración ajustada entre 50 a 85 mmHg, se ha obtenido buenos resultados (Gibbons et al., 1994).

Previo a la aspiración, se succiona solución buffer fosfatada (PBS) adicionada con 0,4 % de albumina de suero bovino (SAB) o 1 % de suero fetal bovino (SFB)+ 10 UI /mL de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre, que es abundante en el tubo de recolección (Hasler, 1992; Nibart et al., 1995), también se puede utilizar solo solución de PBS + heparina (Heyman et al., 2002).

2.8.3 Filtrado

El contenido de la punción cae directamente a un tubo de recolección, el cual se mantiene a una temperatura favorable para los ovocitos (37°C) hasta el momento en que se procede a la búsqueda y clasificación de los ovocitos colectados. El diámetro del filtro utilizado no debe ser mayor de 100 micras (Filtro EMCON), posteriormente el contenido se lava con PBS adicionado con 0,4 % de SAB y 10 UI/mL de heparina sódica (37° C), con la finalidad de eliminar la sangre (Nibart et al., 1995) y facilitar la búsqueda y clasificación de los ovocitos, la cual se realiza mediante un estereoscopio o un microscopio (Marquant-Le et al., 1989).

2.8.4 Clasificación de ovocitos

Los ovocitos que presentan un cumulus oophorus compacto tienen mayores porcentajes de maduración, fertilización y desarrollo hasta la etapa de blastocitos que los que solo presentan corona radiata (Gonella, et al., 2013).

Las células del cumulus son subpoblaciones de células de la granulosa las cuales proveen de nutrientes al ovocito durante el crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto et al., 1996). Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma, de estas categorías en general se considera que solamente los ovocitos tipo A y B poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV (Lonergan et al. 1991).

Cuadro N° 1. Categorías de Complejo Cumulus Ovocito (CCOs)

CLASE	N° DE CÉLULAS CUMULUS	CITOPLASMA
A	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (> 4).	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (1 a 3).	Homogéneo con zonas periféricas oscuras.
C	Desnudados	Irregular con zonas oscuras.
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras.

Fuente: Lonergan et al. (1991).

2.9 USO Y ASPIRACIÓN DE LOS FOLÍCULOS POR OPU

La OPU es una fuente estable de obtención de ovocitos, que permite obtener la mayor descendencia posible en aquellos animales que presenten problemas reproductivos, animales viejos como también de animales genéticamente superiores acelerando los procesos de selección y mejora animal, a la vez que supone una fuente extraordinaria de ovocitos para clonación y transgénesis (Ding et al., 2008). Esta técnica también se emplea para obtener ovocitos de hembras pre-púberes desde un mes hasta tres meses de nacidas disminuyendo el intervalo generacional (Galli et al., 2001; Boni, 2012).

Esta técnica demuestra ser un procedimiento efectivo para obtener ovocitos a partir de animales vivos, siendo un procedimiento no invasivo y repetible que permite incrementar el rendimiento reproductivo de hembras genéticamente superiores al utilizar los ovocitos obtenidos para la producción de embriones a partir de otras biotecnologías como la fertilización *in vitro* (Douar, 1998).

Esta técnica puede realizarse en cualquier momento del ciclo e incluso durante el inicio de la gestación; sin embargo, la fase de reclutamiento que se da

al inicio de una onda folicular es el momento más adecuado (Corredor and Páez 2012).

Con esta técnica de aspiración folicular se puede realizar hasta dos sesiones semanales por un periodo de tres meses sin afectar el ciclo estral (Gordon, 2003; Sendag et al., 2008; Chasombat, et al., 2013).

2.10 ANTECEDENTES DE ASPIRACIÓN FOLICULAR

Seneda et al. (2001), trabajaron en vacas Holstein alimentadas a base de ensilado de maíz y sedimento comercial utilizaron un transductor micro-convexo de 7.5MHz con una guía de acero inoxidable, aguja 19G DE 1.25 cm (Becton Dickinson, Brasil) a través de un tubo de silicona de 2 mm de diámetro con una presión entre 65-70 mmHg. Donde evaluó el tamaño folicular, encontrando ≤ 4 mm (pequeños) 64.2% y folículos >4 mm (grandes) 35.8%, obteniendo una tasa de recuperación de 64.4% de ovocitos, de los cuales 72.2% fueron buenos, 14.4% regulares y 13.4% degenerados.

Seneda et al. (2003), realizaron aspiraciones en vacas de 7 a 9 años de edad, utilizando un ecógrafo (Aloka SSD-500 V) con un transductor micro-convexo DE 5 MHz acoplado a un sistema de aspiración transvaginal convencional (Ceafepe Tecnologia Vet. Sorocaba, Sau Paulo, Brazil) utilizando agujas de aspiración largas (55cm x 18 G) (Cook, Spencer, IN, USA) conectada a por un tubo de teflón hacia un tubo recolector de 50 mL, obteniendo una tasa de recuperación de 48.6%.

Alvarado (2017), realizó aspiración folicular en 10 novillas criollas (*Bos taurus*), aspirando 2 veces por semana, utilizando un ecógrafo Aloka (Aloka

Prosound 2 ®) con transductor convexo de 5Mhz, montado en una guía con una aguja 18Gx75mm de longitud, a una presión de 90mmHg, realizando 100 sesiones de OPU, logrando obtener 262 ovocitos, es decir 2.6 ovocitos por sesión, de los cuales 22.1% fueron de clase A, 33.6% de clase B y 44.3% de clase C.

Ongaratto (2013), en Córdoba trabajó en vacas *Aberdeen Angus* y vacas *Brangus*, utilizando un equipo de ultrasonido Chison 600Vet (Chison Medical Imaging Co., China) equipado con un transductor de 5 MHz micro-convexo y una guía de teflón (WTA, Cravinhos, Brasil), con agujas desechables 18 G (40:12; Terumo, Brasil), a una presión de 60-70 mmHg, con una la bomba de aspiración (WTA, Cravinhos, Brasil) como línea de aspiración utilizó un tubo siliconado que pasó a través de la guía a lo largo del mango de teflón del transductor. Usando además una funda plástica desechable (WTA, Brasil) para evitar la contaminación de la guía y de las vacas durante el procedimiento. Realizo 47 sesiones obteniendo 7.3 ± 0.7 folículos aspirados, $3,2 \pm 0,5$ ovocitos recuperados y $2,1 \pm 0,4$ ovocitos viables.

Quispe y col. (2015), trabajaron en tres razas (*Bos Taurus*) Brown swiss, Holstein y Simmental, vacas cíclicas en lactación, los animales fueron sometidos a un protocolo de sincronización de onda folicular 1.2 mg de Benzoato de Estradiol, 50 mg de progesterona, utilizaron un ecógrafo (DP-50vet, Mindray, China) con transductor micro-convexo a una frecuencia de 7.5 MHZ vía transvaginal con una guía de aspiración folicular (WTA®, Brasil) con aguja de 21G (WTA®, Brasil) conectada a una bomba al vacío, con una presión de 50 mm de Hg. Obteniendo en Brown swiss un promedio de 7 ovocitos por sesión y 2

ovocitos viables por sesión; para Holstein 5 ovocitos por sesión y 2 ovocitos viables.

Rust et al. (2009), determinaron el efecto de la temporada en aspectos de producción de embriones, donde realizaron la aspiración folicular en 40 vacas adultas de diferentes razas (Simmental, Bonsmara, Santa Gertrudis, Romagnola y Brahman), realizando la técnica OPU semanalmente (cada 7 días). Utilizaron un ultrasonido (Pie Medical 200 Vet, Holanda) con un transductor de sector de 5 / 7.5 MHz, con agujas 20 G de 4 cm conectada a un sistema de FIV (conjunto de tubos específicamente para recuperación de ovocitos (Pie medical Holland)) conectada a un tubo falcon de 15 mL que a su vez se conectó a una bomba de vacío (Cooke, Australia) a una presión constante de 60 mmHg. Obteniendo durante los meses de abril y junio una tasa de recuperación de 33.7 y 36.4% respectivamente.

Ayala y col. (2018), trabajaron en dos vaquillas criollas sometidas a dos tratamientos T1= estimuladas hormonalmente y T2= sin estimulación. Alternando las vaquillas en los dos tratamientos, realizando 5 repeticiones. Utilizaron un ecógrafo portátil (Prosound 2, Aloka, Japón) con un transductor sectorial de 5 MHz. Este último fue ensamblado en un soporte para sonda, que contenía la guía de punción conformada por una aguja (1.2x75 mm) conectada a una bomba de vacío (BV-003D, WTA, Brasil) con una presión de aspiración de 70 mmHg. Obteniendo una tasa de recuperación 63.3% de ovocitos para vacas sin estimulación hormonal, de tal tasa, el 13.8% fueron clasificados como A, 25.0% como B, 47.4% como C y 13.8% como D.

Bols et al. (1994), diseñaron un nuevo sistema de orientación para agujas, donde trabajaron en 27 vacas de diferentes razas Belgas, cuyas vacas fueron alimentadas con ración mixta que consistía en heno y concentrado comercial de pellets y alojadas bajo cobertores, alguno de los animales recibieron tratamiento hormonal. Utilizaron además un nuevo sistema de guía para agujas (Terumo NEOLUS 19GX2 "1.1X50), como guiador emplearon un tubo de acero inoxidable (60 cm de longitud x 8 mm de diámetro), la aguja se conectó mediante un conector de acero inoxidable a un tubo de silicona de 4 mm (Tubo Silclear TM, Tubo de silicona de grado medico multiusos, Silicona Degania/ Israel) que pasó a través de un tubo de acero inoxidable (60 cm x 6 mm), este sistema de agujas fue incorporado en un nuevo dispositivo OPU con el transductor (Pie medical 200 Vet). También determinaron que el uso de un tubo de guía, tiene muchas implicaciones, ya que el eje de la aguja se alejó del centro del transductor, perdiendo la aguja su longitud útil no llegando al área de escaneo, debido al diámetro del tubo guía de 8 mm, concluyendo que la posibilidad para superar este problema es la utilización de agujas más largas (80- 100 mm) o bien el uso de un transductor con un campo de escaneo más amplio; para tal caso utilizaron un transductor mecánico de sonda múltiple de 150° de área de escaneo, llegando a obtener una tasa de recuperación de 42 %.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar, departamento de Puno. Geográficamente se ubica a una distancia de 156 Km. de la Ciudad de Puno, entre las coordenadas Latitud Sur 14° 47' 37", Longitud Oeste 70° 47' 50", a una altitud de 3974 m. (SENAMHI, 2016).

3.2 ANIMALES

Para el presente estudio, se trabajó con 4 vacas en seca de raza Brown Swiss entre 8 a 10 años de edad, realizando un total de 24 sesiones de aspiración folicular (6 sesiones/vaca), las sesiones se hicieron semanalmente.

3.3 MATERIALES UTILIZADOS PARA LA ADECUACIÓN DEL ASPIRADOR FOLICULAR

- Equipo de ultrasonido (ecógrafo) marca CHISON VET
- Transductor endovaginal de uso humano (modelo R14)
- Tubo de plástico PVC (diámetro 50mm x 50 cm de largo) utilizado para mango de aspiración.
- Tubo de aluminio (50 cm de largo y 9 mm de diámetro) utilizado para guiador de la aguja de aspiración.
- Pipeta de plástico de inseminación artificial (45 cm) utilizado como guía de aguja.
- Tubo de silicona (WTA) utilizado como línea de aspiración.
- Tubo Falcon de plástico de 50 mL, utilizado como tubo colector
- Tapón de aspiración (WTA Brazil).

- Bomba de vacío (vakuumpumpe N86 KN.18).
- Jeringas de tuberculina (pivote), utilizado para acoplar al tubo guía, como también para la guía de aguja.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Preparación de los animales

- a) Las vacas previas al trabajo fueron entrenadas al flujo de manejo (Ingreso y salida del brete, aplicación de anestesia vía epidural, extracción de las heces del recto, limpieza y desinfección de la vulva y la zona perineal) para la aspiración folicular.
- b) La vaca fue ingresada al brete, seguidamente se colocó la anestesia (clorhidrato de lidocaína al 2%) vía epidural aplicando 5 a 6 mL/vaca. (Fig. 14 anexo)
- c) Se extrajeron las heces del recto, procediendo a la limpieza de la región perianal y vulva, desinfección y secado con papel toalla. (Fig. 14 anexo)

3.4.2 Aspiración folicular

- a) El aspirador previo a su utilización fue sumergido (cabeza del transductor) en solución desinfectante (clorhexidina 1%), luego se aplicó gel de ecografía sobre el transductor, cubriendo además este con una funda de plástico, evitando que exista aire entre la funda y la cabeza (cristales) del transductor (Fig. 15 anexo)
- b) Con gel de ecografía se lubricó el aspirador y se introdujo dentro de la vagina; con la otra mano introducida vía rectal, se cogió los ovarios

entre los dedos, acercando el ovario hacia el transductor (frecuencia 7 MHz) para así ubicar los folículos (Fig.16 anexo)

- c) Situado en los folículos, se introdujo la aguja por dentro del guiador (tubo de aluminio), traspasando la pared vaginal. Observando a la imagen del ecógrafo, la aguja (imagen híperecoica o blanca) se dirigió hacia los folículos (imagen anecoicas u oscuras) (Fig. 17 y 18 anexo)
- d) Se hizo la punción, aspirando todo el líquido folicular hacia el tubo colector, para tal aspiración se empleó una bomba de vacío a una presión de 75 mmHg (Fig. 19 anexo)
- e) Terminada la aspiración, se succionó solución preparada para aspiración (PBS+1% de suero fetal+ heparina), con la finalidad de lavar la línea de aspiración.

3.4.3 Solución para aspiración

PBS (Solución Buffer Fosfatada) + 1% de SFB (suero fetal bovino) + 10 U.I. de heparina/mL+ 25 ug/mL de gentamicina (Hasler, 1992).

- PBS, para mantener el pH adecuado de los ovocitos.
- SFB, como fuente energética y evita la adherencia de los ovocitos.
- Heparina, evita la coagulación al momento de la punción.
- Gentamicina, como agente protector frente a agentes extraños.

3.4.4 Evaluación de los ovocitos

- a) El tubo colector conteniendo el líquido aspirado, se vertió hacia un filtro Emcon (filtro para embriones), reteniendo solo a los ovocitos.
- b) Luego se añadió al filtro solución (PBS), a modo de lavar los ovocitos, realizando esta operación 2 a 3 veces. (Fig. 20 anexo)
- c) Con un poco de solución PBS en el filtro, se vertió hacia una placa petri, posterior se llevó al microscopio, para la observación y clasificación de los ovocitos. (Fig. 21 anexo)
- d) Para la clasificación de los ovocitos se tomó en cuenta la calidad de las células del cúmulo oophorus (Lonergan et al., 1991):
 - Bueno: que posean más de tres capas de células del cúmulo
 - Regular: al menos que posean una capa de células
 - Desnudos: que no estén cubiertos de células del cúmulo
 - Atrésicos: las células del cúmulo oscuras y signos de degeneración del citoplasma

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos sobre tamaño folicular se expresaron en valores porcentuales, realizando además un gráfico de barras para poder observar la distribución porcentual del tamaño de folículos presentes en las diferentes sesiones de OPU.

Por otro lado como variables:

(A) La recuperación de ovocitos (ovocitos/punción).

(B) La calidad de ovocitos (categoría a 4 escalas).

(C) Animales (vacas).

Los resultados obtenidos para cada variable, fueron sometidos a la prueba de Chi-cuadrado ($\alpha=0.05$) mediante el programa estadístico R 3.4.4., para determinar si existe dependencia o independencia entre la variable (A) y (C), como también entre la variable (B) y (C).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ADECUACIÓN DE UN ASPIRADOR FOLICULAR

4.1.1 Transductor

Se empleó un transductor endovaginal de uso humano micro-convexo (modelo R14) (Fig. 2), el cual tiene un área de escaneo de 120° (campo de vista), que permite una vista completa del ovario, mientras que los aspiradores foliculares modernos exclusivo para vacunos utilizan transductores convexos o micro-convexos de 5.0 – 7.0 MHz, de uso veterinario, los cuales solo tienen un área de escaneo de 90° (Seneda et al. 2003; Quispe y col. 2015; Alvarado, 2017).

Un campo ultrasónico orientado hacia adelante en un ángulo de 90 grados en combinación con un sistema de aguja, provoca una larga distancia entre el eje de la aguja y la cabeza del transductor, como consecuencia la longitud útil de la aguja se acorta, para superar este problema, se puede utilizar un área de escaneo expandido (Bols et al. 1994). Por esta razón los investigadores arman el transductor micro-convexo hacia un mango para OPU, elevando ligeramente la cabeza del transductor hacia el eje de salida de la aguja, con la finalidad de expandir el campo de visión hacia la aguja (Fig. 3) (Bols et al. 1994; Seneda et al. 2003). Si bien la elección del tipo del transductor es una variable, la mayoría de autores describen el uso de transductores de tipo micro-convexo (Seneda et al., 2003; Ongaratto, 2013; Alvarado y col., 2015).



Figura 2. Transductor endovaginal de uso humano

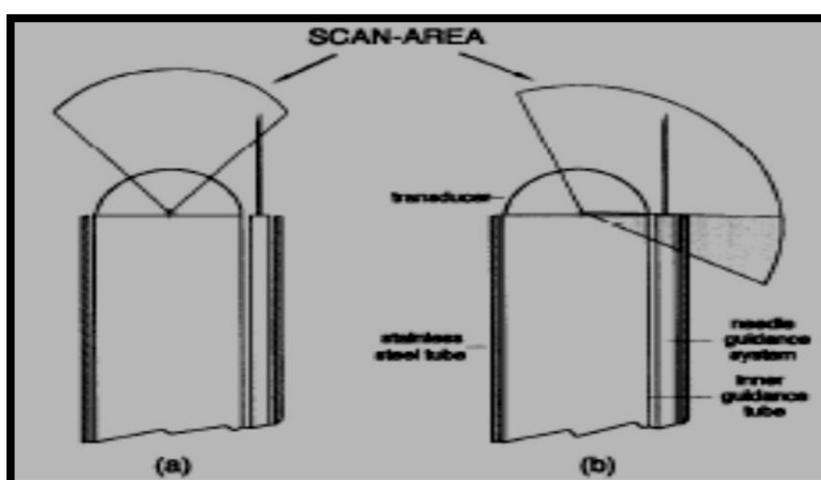


Figura 3. (a) Campo ultrasónico de 90° y (b) campo ultrasónico >90° adecuado hacia la aguja (Bols et al. 1994)

4.1.2 Mango para aspiración

Para obtener un mango de aspiración se adecuó un tubo de plástico PVC (50mm de diámetro x 50 cm de longitud), al transductor endovaginal humano, el que sirvió de mango de soporte para el transductor (Fig. 4), esta adecuación se hizo algo similar al de Bols et al. (1994), quienes utilizaron un soporte de acero inoxidable con un diámetro de 45 mm con una empuñadora (hand grip) diseñada para permitir que el operador fije el dispositivo OPU, mientras esta colocado en la vagina, quienes obtuvieron 42% de recuperación de ovocitos.

Mientras que Seneda et al. (2003) utilizaron un dispositivo (Ceafepe tecnología vet. Brazil) diseñada a medida a un transductor de 6.0 MHz, además de ello, este dispositivo de fábrica, lleva consigo el tubo guía para la aguja de aspiración, llegando a obtener una tasa de recuperación de hasta 50% de ovocitos.

Recientemente, los detalles técnicos del dispositivo OPU se han convertido en un tema importante, así Bols et al. (2004) utilizaron un mango para OPU de 60 cm de longitud. (Nutricell Esaote-Pie Medical, Brazil), al igual que Ruiz (2010) y Matthiesen (2011),



Figura 4. Transductor montado sobre el mango de aspiración

4.1.3 Guiador para la aguja de aspiración

Para usar como guiador se utilizó un tubo de aluminio (50 cm de largo x 9 mm de diámetro) al que se adoso en uno de los extremos, un pivote de jeringa de tuberculina, con la finalidad de reducir el diámetro a la salida de la aguja (Fig. 5), para así realizar una punción firme. Tal guiador se montó por encima del mango (tubo de plástico PVC), el cual se aseguró a través de ganchos en la parte anterior, medio y final del mango (Fig. 6).

En tanto Bols et al. (1994) utilizaron un tubo de acero inoxidable de 60 cm de largo x 8 mm de diámetro, teniendo importancia el diámetro, ya que a mayor diámetro, el eje de la aguja se alejara más del centro del transductor, ocasionando por ende la disminución del área de escaneo.

En cambio Seneda et al. (2003) y la mayoría de autores utilizaron un dispositivo adaptado (Ceafepe tecnología vet. Brazil) que hace de mango para OPU, este dispositivo lleva consigo la guía para la aguja de aspiración de modo que se acopla al transductor de manera perfecta, sin la necesidad de acoplar otros tubos.

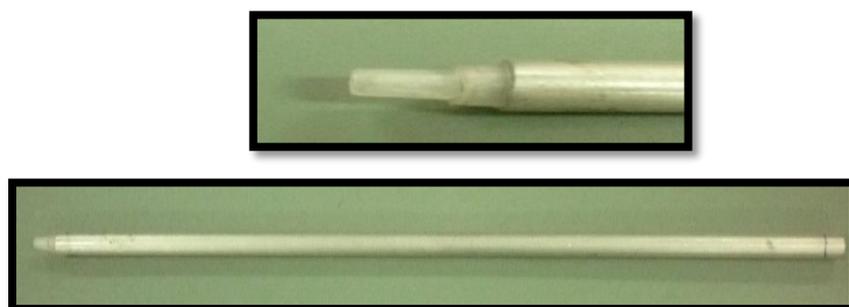


Figura 5. Tubo de aluminio (guiador)



Figura 6. Guiador montado sobre el transductor

4.1.4 Guía de aguja y línea de aspiración

Como guía de aguja se utilizó una pipeta de inseminación de plástico (45 cm de largo x 5 mm de diámetro), a la que se unió en el extremo posterior, el pivote de una jeringa de tuberculina, esto para acoplar la aguja; en tanto por el interior de la pipeta fue atravesando la línea de aspiración (tubo de silicona 2 mm), llegando a conectarse a la aguja (Fig. 7), mientras que Bols et al. (1994) Utilizaron un tubo de acero inoxidable (6 mm de diámetro x 60 cm de largo), donde la aguja fue unida por medio de un conector de acero inoxidable; la línea de aspiración (Tubo Silclear TM, Silicona Degania/ Israel) de 4 mm de diámetro, fue atravesando por interior del tubo de acero uniéndose al conector de acero y este a la vez a la aguja de aspiración, de igual procedimiento al presente estudio.

Este tipo de armado en el presente estudio se realizó por tener estos materiales a disposición en el mercado, además de ser económicos, pero sin perder el principio de OPU, para su desenvolvimiento adecuado.

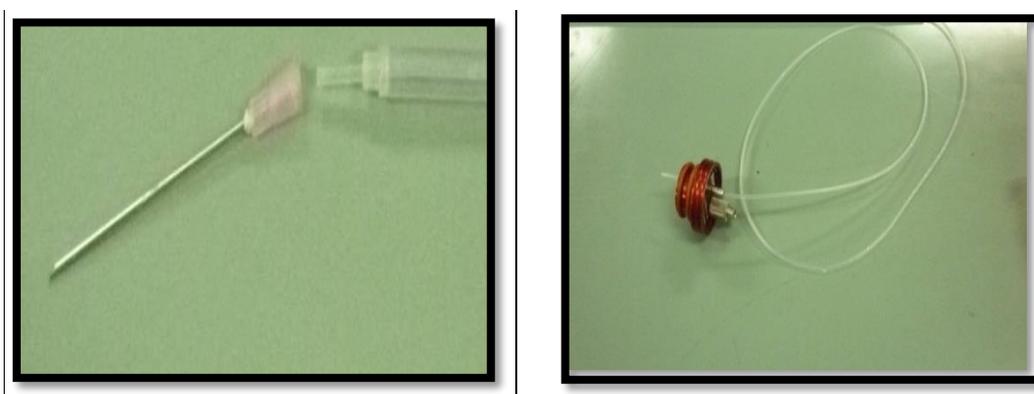


Figura 7. Guía de aguja y línea de aspiración

4.1.5 Tubo colector y tapón de vacío

Como tubo colector se utilizó un tubo Falcon de 50 mL de plástico y un tapón de vacío (WTA BRAZIL) (Ongaratto, 2013; Quispe y col. 2015). El tapón de vacío presenta dos tornillos de seguridad (pequeño y grande), grande para la manguera de vacío y pequeño para la línea de aspiración (Fig. 8).



Figura 8. Tubo colector y tapón de vacío

4.1.6 Bomba de aspiración

Se utilizó una bomba de vacío (Vakuumpumpe N86 KN.18), a una presión de 85 mmHg (Fig. 9), similar a Seneda et al. (2003) y Alvarado (2017) quienes trabajaron con presiones entre 80 - 90 mmHg, utilizando una bomba de vacío (Cole Parmer, Vernon, USA).

En tanto Neglia et al. (2003) y Rust et al (2009) utilizaron una bomba de vacío (K-MAR-5100 Cook IVF CO., Australia) con una presión constante de 40 mmHg a 60 mmHg.



Figura 9. Bomba de vacío para aspiración

4.1.7 Agujas de aspiración

Se utilizó agujas 18G de 7 cm de largo (Fig. 10), similar a los que utilizó Hashimoto et al. (1998) y Alvarado (2017) agujas desechables 18G, 7 cm de longitud. (Fujihira Industries Co., Tokyo, Japan). Donde de acuerdo a los reportes las mayores tasas de recuperación de ovocitos se obtuvieron con agujas gruesas (18G) independiente del vacío de aspiración (Bols et al. 1996). A diferencia Neglia et al. (2003) y Seneda et al. (2003) utilizaron agujas largas de 17G de 50 cm de longitud y 18G de 55 cm de longitud respectivamente.



Figura 10. Agujas de aspiración

4.2 CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS

4.2.1 Porcentaje de folículos según tamaño (mm)

La figura muestra la distribución porcentual de los folículos visualizados según tamaños (mm) mediante ultrasonografía, en las 6 sesiones de aspiración en cada vaca.

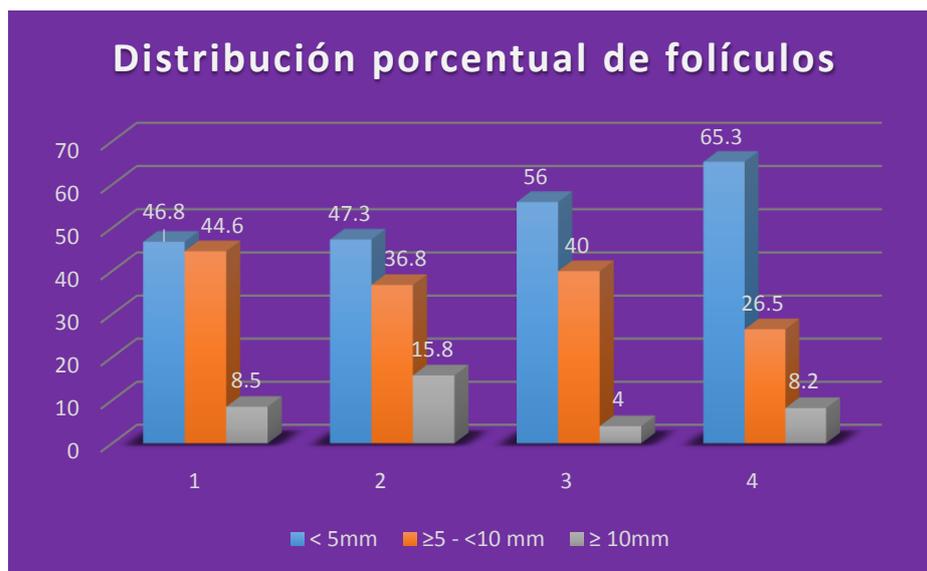


Figura 11. Distribución porcentual de folículos según tamaño (mm)

En la figura se aprecia que para cada vaca, hay una mayor cantidad de folículos pequeños (<5mm) que folículos grandes (≥ 10 mm), esta predominancia de folículos pequeños se debería a la dinámica folicular, como se sabe en la dominancia, el folículo dominante producirá inhibina la cual detendrá el crecimiento de los demás folículos reclutados, mostrándose por tanto una mayor cantidad de folículos pequeños. Este folículo dominante secreta grandes cantidades de estrógenos estimulando a la LH para la ovulación, e inhibina por lo que detiene el crecimiento de los demás folículos reclutados (Galli et al., 1991).

Tabla 1. Porcentaje de tamaño folicular en general (4 vacas).

Tamaño Folicular	< 5mm	≥5 - <10 mm	≥ 10mm	Total
n° Folículos	100	68	16	184
%	54.3	37.0	8.7	100

La tabla 1, muestra número de folículos y valores porcentuales (4 vacas) según tamaño, donde se obtuvieron el 54.3% para folículos < 5mm, 37.0 % para folículos de ≥ 5 a <10 mm y 8.7% de folículos mayores a ≥ 10 mm. En tanto, Seneda et al. (2001), reportan en vacas Holstein 64.2% folículos <4mm (pequeños) y 35.8 % folículos >4mm (grandes), siendo estos resultados ligeramente superiores al presente trabajo en cuanto a folículos pequeños, esta diferencia se debería a que los autores trabajaron con la raza Holstein, en ambiente cálido, a diferencia nuestra que se trabajó en meses secos (mayo-junio) rescatando que en el ganado *Bos taurus*, el efecto de desarrollo folicular parece más pronunciado durante los meses más cálidos (Zeitoun et al, 1996).

Así mismo Bols et al. (2004) mencionan haber hallado una mayor cantidad de folículos pequeños (< 5mm) 74.4% en relación a folículos grandes (≥ 5 mm) 25.6 %, generalmente habrá una mayor cantidad de folículos pequeños por causa de la dominancia de un folículo, quien inhibe el crecimiento del resto de folículos, siendo en el reclutamiento los folículos menores a 4 mm (Moussa, et al. 2015).

4.2.2 Recuperación de ovocitos.

La tabla 2 muestra el número de sesiones por animal, número de folículos aspirados, número de ovocitos recuperados, así también el porcentaje de ovocitos recuperados del total de punciones.

Tabla 2. Ovocitos recuperados por punción.

N° vaca	N° sesiones	N° folículos aspirados	N° Ovocitos recuperados	Recuperados /aspiración
896	6	15	2	2/15 (0.133)
762	6	19	3	3/19 (0.158)
998	6	20	5	5/20 (0.250)
770	6	18	4	4/18 (0.222)
TOTAL	24	72	14	14/72 (0.194)

(P>0.05)

Los valores obtenidos sometidos a una prueba de Chi cuadrado no muestran diferencia estadística lo que indica que el factor animal no influye en la mayor o menor recuperación de ovocitos, ya que se trabajó con vacas de la misma raza y de la misma edad.

De un total de 72 punciones realizadas, solo se ha recuperado 14 ovocitos (0.194), viniendo a ser una tasa de 19.4% como recuperación general. Autores como Rust, et al (2009), reportaron una tasa de recuperación de 33.7% y 36.4 % en los meses de abril y junio respectivamente, mientras que Bols et al (1994) y Hashimoto et al. (1998) obtuvieron una tasa de recuperación de 42% y 44.2% respectivamente.

Estos resultados contrastados al presente trabajo (19.4%), son mayores, esta superioridad obtenida por los autores se debe a que ellos trabajaron con equipos específicos para aspiración folicular, así (Bols et al., 1994) menciona que para optimizar la técnica OPU y aumentar la tasa de recuperación de ovocitos es importante el sistema de guía de agujas para la aspiración folicular

Así Rust et al. (2009), utilizaron un transductor sectorial equipado con un dispositivo de biopsia vaginal y una guía de aguja montada dorsalmente, diseñada específicamente para OPU bovina. Por otra parte Bols et al., (1994) en algunas vacas en las que trabajaron estimularon el ovario con hormona folículo estimulante, con el objetivo de aumentar las tasas de recuperación, existen diversos protocolos hormonales a fin de obtener grupos ovocitarios más homogéneos en vacas (*Bos Taurus*) que generalmente tienen pocos folículos (Merton et al., 2003). Mientras que en el presente estudio no se realizó ningún tipo de estimulación, utilizando además un equipo de aspiración folicular acondicionado con diferentes piezas, también por ser la primera experiencia del operador en aspiración folicular. El operador puede determinar grandes variaciones en el número de folículos aspirados y el número de ovocitos recuperados (Nibart et al., 1995).

Similar al presente trabajo Pieterse et al. (1988), emplearon un equipo acondicionado, donde emplearon agujas largas de 50 cm, logrando obtener un 24% de recuperación, aspirando folículos de 3 a 10 mm.

4.2.3 Ovocitos obtenidos según clasificación

La tabla 3, muestra el número y porcentaje de ovocitos obtenidos según categoría (clasificación a 4 escalas).

Tabla 3. Número de ovocitos obtenidos según categoría

N° vaca	Ovocitos obtenidos	Categoría de ovocitos			
		A	B	C	D
896	2	2			
762	3	1	2		
998	5		1		4
770	4			2	2
Total	14	3	3	2	6
%	100	21.4	21.4	14.3	42.9

(P<0.05)

En la tabla se aprecia un 21.4 % para categoría A como para categoría B, sumadas ambas 42.8 % (ovocitos viables), para categoría C 14.3 % y para categoría D 42.9%.

La elevada obtención de ovocitos categoría D se debería a la presión de aspiración, la cual no haya podido ser muy bien controlada. Siendo la presión muy importante en la calidad de los ovocitos, obteniendo un mayor número de ovocitos recuperados con el aumento de la presión de vacío, pero disminuyendo la calidad de los mismos (Bols et al., 1996).

Los ovocitos recuperados según categoría en las diferentes sesiones de OPU muestran diferencia estadística al ser sometidos a la prueba de Chi cuadrado, así en las vacas (998 y 770) se obtuvo ovocitos de mala calidad (C y D) esta variación en las categorías de ovocitos podría deberse al factor estrés animal e intranquilidad de algunas vacas

durante el proceso de aspiración folicular; una vaca al estar nerviosa dificulta el trabajo de aspiración, por tanto los animales responden de manera diferente a la aspiración folicular. Se ha demostrado que diferentes donadoras presentan resultados variables tanto en la producción y la calidad de los ovocitos (Nibart et al., 1995).

Ayala y col. (2018) utilizando un transductor sectorial de 5 MHz, obtuvieron un 13.8% de ovocitos de clase A, 25.0% de clase B, 47.4% de clase C y 13.8% de clase D, considerando como viables A y B (38.8%), siendo este valor, menor a lo encontrado en el presente estudio A y B (42.8%).

Mientras, Alvarado (2017), aspirando 2 veces por semana en novillas criollas (*Bos Taurus*) obtuvo 22.1% ovocitos de clase A, 33.6% de clase B y 44.3% de clase C (escala a 3 categorías), comparado estos resultados a los valores encontrados en el presente trabajo, categoría A 21.4%; categoría B 21.4%; categoría C 14.3% y categoría D 42.9% (escala de 4 categorías) (Lonergan et al. 1991), son valores similares en categoría A, menores en B y mucho mayor los nuestros en C y D obteniendo mayor número de ovocitos degenerados, esto debido a que la presión de aspiración haya podido fluctuar, superando los 70 a 80 mmHg, disminuyendo así el número de ovocitos viables. En un estudio (Bols et al., 1996) demostraron que la presión es muy importante en la calidad de los ovocitos, habiendo un mayor número de ovocitos recuperados con el aumento de la presión de vacío, pero disminuye el número de células presentes en el cúmulus; ya que la presión de

aspiración que se alcanza en la punta de la aguja depende tanto de la presión negativa ejercida por la bomba de aspiración como del largo y ancho del sistema de tubos de recolecta y del diámetro de la aguja utilizada.

(Seneda et al., 2001) y (Bols et al., 2004) obtuvieron tasas de ovocitos, categoría A entre 50–60 % y categoría B 10–20 %, esta superioridad que obtuvieron se debería también a la diferente metodología y sistema de aspiración que utilizaron; como transductor, sistema de guía, presión de vacío, diámetro de aguja, etc. Así (Seneda et al., 2001) utilizaron un transductor micro-convexo de 7.5MHz con una guía de acero inoxidable, aguja 19G DE 1.25 cm (Becton Dickinson, Brasil) a través de un tubo de silicona de 2 mm de diámetro con una presión entre 65-70 mmHg. Mientras que en el presente estudio se empleó un equipo de aspiración armado, adecuando un transductor endovaginal humano, además de ser la primera experiencia en la aspiración folicular. Al usar OPU de forma rutinaria, se mejora la técnica ya que se trata de adaptar todos los sistemas que son fundamentales durante la aspiración folicular (Lansbergen et al., 1995).

V. CONCLUSIONES

- La adecuación del transductor endovaginal humano se puede utilizar en la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía en vacas en pie, realizando algunos ajustes para obtener mejores resultados.
- La tasa de recuperación general de ovocitos fue de 19.4% y los valores porcentuales obtenidos según categoría fueron 21.4% A; 21.4% B; 14.3% C y 42.9% D respectivamente.
- La efectividad y experiencia del operador influye en gran medida al momento de realizar la aspiración folicular.

VI. RECOMENDACIONES

- El equipo de aspiración folicular adecuado en el presente estudio se puede utilizar para la recuperación de ovocitos en vacas en pie.
- Se recomienda realizar la aspiración folicular en un ambiente que posea una instalación adecuada (ambiente oscuro, brete, mesas para el equipo y registros).
- Se recomienda realizar ajustes continuos al equipo de aspiración folicular para llegar a tasas de recuperación recomendadas
- Manejar un adecuado pH de los medios utilizados para el proceso de colección de ovocitos

VII. REFERENCIAS

- Adams, G. P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 17-32. *Aspiração Folicular e Fecundação In Vitro.* Faculdade de Medicina e Zootecnia.
- Alvarado, A., G. Gamarra, A. Gallegos y V. Samillan. 2016. "Tasa de Recuperación de ovocitos en vacas holstein en descarte." *Universidad Nacional Agraria La Molina; Anales Científicos*, 77; pag 63-68.
- Alvarado, M. 2017. Evaluación de La calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. Maestría en reproducción animal, Facultad de ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Ecuador
- Argov, N., A. Arav, and Sklan, D. 2004. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology* 61: 947-962.
- Arlotto, T., J.L. Schwartz, N.L. First, M.L. Leibfried. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45:943-956.
- Ayala L., J. Samaniego, P. Nieto, R. Rodas, J. Dután, G. Calle, Y. Murillo, J. Vázquez, D. Argudo y F. Perea. 2018. Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. Laboratorio de Biotecnología Animal Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador. *Rev Inv Vet Perú* 2018; 29(2): 552-558
- Azambuja, R.M.; Watanabe, M.R.; Lobo, R.B. 1997. Efeito da experiência do veterinário na aspiração in vivo de oócitos de vacas zebuínas através da ultrassonografia. Resultados preliminares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.26, n.1, p.70-171,
- Bage, R., S. Petyim, B. Larsson, T. Hallap, A. Bergqvist, H. Gustafsson and H. Rodríguez-Martínez. 2003. Oocyte competence in repeat-breeder heifers:

- effects on optimized ovum pick-up schedule on expression of oestrus, follicular development and fertility. *Reproduction Fertility and Development* (15):115-123.
- Beg, M.A. and O.J. Guither. 2006. Follicle selection in cattle and horses: Role of intrafollicular factors *Reproduction.*; 132:365-77.
- Bellenda, O. 2003. *La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo*, Montevideo – Uruguay
- Bols P., A. Van Soom, M. Ysebaert, J. Vandenheede and A. Kruif 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocytes complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45: 1001-14.
- Bols P., J. Vandenheede, A. Van Soom, and A. Kruif. 1994. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*. 43: 677-87.
- Bols, P. E., J. L. Leroy, T. Vanholder and A. Van Soom. 2004. A comparison of a mechanical sector and linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology* 62, 906-914.
- Bols, P.E., M.T. Ysebaert, A. Van Soom and A. Kruif 1997. Effects of needle tip level and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocytes complexes. *Theriogenology* 47:1221-1236.
- Boni, R. 2012. "Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis." *Animal Reproduction*, V.9; pag 362-369.
- Canipari, R. 1994. Cell- cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 2: 343-345
- Chasombat, J., N. Denpong, N. Takashi, P. Rangsun and V. Thevin. 2013. "Superstimulation of Follicular Growth in Thai Native Heifers by a Single Administration of Follicle Stimulating Hormone Dissolved in Polyvinylpyrrolidone." *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 59, No 2, pp 214–218.

- Chaubal S. A., J.A. Molina, C.L. Ohlrichs, L.B. Ferre, D.C. Faber, P.E. Bols, J.W. Riesen, X. Tian and X. Yang. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65: 1631-1648.
- Clark, T. 2002. Evaluation of outpatient hysteroscopy and ultrasonography in the diagnosis of endometrial disease. *Obstet and Gynecol*; 99: 1001-1006.
- Core, R. Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.[Internet]. Available in: <http://www.R-project.org/>
- Corredor, E. and E. Páez. 2012. "Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina: revisión." *Ciencia y Agricultura* Vol. 9 - N°. 2; pag 2937 http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_agricultura/article/view/2813/2581
- Cran, D. and I. Johnson. 1996. The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. *Human Reproduction Update*; 2(4):355-363.
- Denis, R.G., J.A. Prado, N. Puertas, D. Fuentes, A. Bernal, I. Núñez, A. Torres, M. Ruiz y M. Cárdenas. 2000. Introducción de la ultrasonografía en la reproducción animal. Manual. La Habana: CIMA, p. 2-40.
- Ding L.J., H.B. Tian Wang, H.Y. Chen Sha, J.Q. Chen and G.X. Cheng. 2008. Different Intervals of Ovum Pick- Up Affect the competence of Oocytes to Support the Preimplantation Development of Cloned Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev.* 75: 1710-1715.
- Douar, C. 1998. Effect de la composante maternelle sur le development *in vitro* de l'embryon bovin. *Maitrise Sciences Vétérinaires. Physiologie de la Reproduction.* Ecole Nationale Vétérinaire Maison-Alfort: 17-24.
- Fernandez, M. 2003. El ciclo estral de la vaca. Editorial Servet. Zaragoza, España.

- Frederick, J.L., R.J. Paulson and J.V. Bax. 1991. Routine use of vaginal ultrasonography in the preoperative evaluation of gynecologic patients: An adjunct to resident education. *Reprod. Med.* 36: 779-786.
- Fry, R.C., T.C. Simpson, T.J. Squires, R.A. Parr, and R.M. Damanik. 1994. Factors affecting transvaginal oocytes pick-up in heifers. *Therionelology* 41:197.
- Galina, C. y J. Valencia. 2008. Reproducción de los animales domésticos. Tercera edición. Editorial Limusa. México.
- Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi, and G. Lazzari. 2001. "EMBRYO PRODUCTION BY OVUM PICK UP FROM LIVE DONORS." Elsevier; *Therionelology* 55; Pag1341-1357.
- Gibbons, J.R., W.E. Beal, R.L. Krisher, E.G. Faber, R.E. Pearson and F.C. Gwazdauska. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Therionelology* 94, 41:206 abstr.
- Giraldo, C. 2003. Principios básicos de ultrasonografía veterinaria. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Disponible en: http://www.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/mvz_82.htm.
- Goddard, P. 2000. Ecografía veterinaria. Editorial Acribia.
- Goldstein, S. 1992. Ultrasonografía vaginal para el medico en ejercicio. *Clinicas de Norteamerica*; 2: 139-140.
- Gonella, A., J. Atuesta, S. Bernal and L. Chacón. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*; Volumen 4 Número; pag 65-80.
- Gordon, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. 2da edición. Dublin: CABI Publishing.
- Gwazdauskas, F.V., K.W. Kendrick, A.W. Pryor, and T.I. Balley. 2000. Symposium: Folliculogenesis in the bovine ovary. *J Dairy Sci.*; 83:1625-34

- Hashimoto, S., R. Takakura, N. Minami and M. Yamada. 1998. Ultrasound-guided follicle aspiration: Efecto of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. Laboratory embryo transplantation, Hokkaido 059-1365, Japan. Elsevier, Theriogenology 52: 131-138
- Hasler, J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. Journal of Dairy Science 75:139-168.
- Hasler, J.F., W.B. Henderson, P.J. Hurtgen, Z.Q. Jin, A.D. McCauley, S.A. Mower, B. Neely, L.S. Shuey, J.E. Stokes and S.A. Trimmer. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 3:141-152.
- Hernández-Fonseca, H. 2001. Fertilización in vitro en Reproducción Bovina. C González- Stagnaro (Ed). Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 411-426.
- Heyman, I., P. Chavatte-Palmer, D. LeBourhis, S. Camous, X. Vignon and J.P. Renard. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. Biology or Reproduction 66:6-13.
- Hofer, M. 2006. Curso básico de ecografía 5ª Edición. Editorial medica panamericana. p. p. 6-9.
- Huanca, W., 2001. Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Vacas Lecheras. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 2001; 12(2): 161-163
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2013. Resultados definitivos del IV censo nacional Agropecuario. Lima- julio.
- Kruij, T., R. Boni, Y.A. Wurth, M.W. Roelofsen and M.C. Pieterse. 1994. Potential use of Ovum Pick-Up for embryoproduction and breeding in cattle. Theriogenology; 42: 675-684.
- Lansbergen, L.M., V. Leeuw, J.H. Daas, L. Ruig, G. Van der Strek, REINDERS, J.M. Reninders, M. Aarts and J. Rodewijk 1995. Factors affecting ovum

pick-up in cattle., Theriogenology, v.43 p.259

- Lonergan, P., E. Vergos, A. Kinis, H. Sharif and I. Gordon. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. Theriogenology 35:231.
- Lucy, M.C., W.W. Thatcher, J.D. Savio, G. Danet-Desnoyers, M.T. Moser, L. Badinga, F.A. Simmen and R.J. Collier. 1992. Effect of bovine somatotropin on ovarian follicles, corpora lutea and embryos during early pregnancy in cattle. Journal of Animal Science 70(Suppl 1) 271 (Abstract).
- Mackey, D.R., A.R. Wylie, J.M. Sreenan, J.F. Roche and M.G. Diskin. 2000. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin and steroid concentration in beef heifers. Anim Sci.; 78:429-42.
- Manrique, S. 1990. Fisiología de la reproducción de ganado lechero, disponible en:<http://www.ceniap.fonciap.go.pe/digital/Fdigital/Fdival/fd33/texto/fisiologia.htm>.
- Marquant-Le, B. Guienne, B. Gerard, A. Solari and C. Thibault. 1989. *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. Reprod. Nutr. Dev. 29:559-568,
- Matthiesen, M. 2011. Effect of donor age on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes obtained by repeat OPU from nonstimulated and FSH-superstimulated German Simmental heifers and cows at different life cycles stage. Departamen for veterinärwissenschaftender Tierärztlichen facultad de Ludwig-Maximilians University Munchen, Munchen.
- Mattioli, M., G. Galeati, M. Bacci, and E. Seren. 1994. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cell and oocyte Gamete. Res, 21, 223-232
- Mellisho, E., 2011. Manual de Reproducción de ganado de Carne. Agro banco. Lima, Perú

- Menduri, G., A. Bachelot, M.P. Cocca, C. Vasseur, P. Rodien, F. Kuttenn, P. Touraine and M. Misrahi. 2008. Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology molecular and cellular endocrinology volume 282, Issues 1-2, 30.
- Merton, J. S., A. P. de Roos, E. Mullaart, L. de Ruigh, L. Kaal, P. L. Vos and S. J. Dieleman. 2003. "Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry." Elsevier; Theriogenology 59; pag 651-674.
- Montaño E. y Z. Ruiz. 2005. ¿Por qué no ovulan los primeros folículos dominantes de las vacas cebú posparto en el trópico colombiano? Rev. Col. Cienc. Pec. Vol. 18:2.
- Moore, P.A., A.J. Bettany and A.J. Brown. 1990. Multiple copies of the pyruvate kinase gene affect yeast cell growth. J Gen Microbiol 136(12):2359-66.
- Moussa, M., J. Shu, X. H. Zhang, and F. Zeng. "Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". Elsevier; Animal Reproduction Science; 17 pp. 2015.
- Murphy, B.D. y N. Pescador. 1996. Biología celular de la Foliculogénesis bovina. En: II Simposio Internacional de Reproducción Animal. Resúmenes. Córdoba, Argentina. 31 octubre-2 noviembre, p. 1-11
- Murugavel, K. 2003. Reproductive performance of dairy cows following different estrous synchronization protocols. Ph. D. dissertation. Universidad autónoma de Barcelona. Barcelona, pp. 137
- Neglia, G., B. Gasparrini, V. di Brienza, R. di Palo, G. Campanile, G. Presicce and L. Zicarelli. 2003. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. Theriogenology. 59, 1123-1130.
- Nibart, M., Le-Marquant and B. Guienne. 1995. Production d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. Elevage et Insémination 266:1-23,
- Ongaratto, F. 2013. Control del desarrollo folicular para la Obtención de cocs por aspiración guiada por ultrasonografía. Maestría en Reproducción

- Bovina Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.
- Perera-Marín, G., C. Murcia, S. Rojas, J. Hernández-Cerón and E. González-Padilla 2005 Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science.*; 86:53-69.
- Petyim, S., R. Bage, T. Hallap, A. S. Bergqvist, H. Rodríguez-Martínez and B. Larsson. 2003. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifer: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 60:175-188.
- Picton, H. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, 55:1193-1210.
- Pieterse, M.C., R.A. Kappen, T. Kruip and M. Taveme. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*; 30: 751-762.
- Quintela, L., C. Díaz, P. Herradon, M. Peña y J. Becerra. 2006. Ecografía y reproducción en la vaca. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de 542 Compostela, España. Pp 10-50.
- Quispe, C., E. fernández, E. Ancco, K. Oriundo y E. Mellisho. 2015. Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiracion folicular guiada por ultrasonografia transvaginal. *Spermova*; 5(1): 59 - 62
- Rosell, R., R. Llorente, A. Ramírez, M. Verdecia y E. Hernández. 2008. Ultrasonografía y su uso en la producción animal. Universidad de Granma, Central del Batey, Campechuela. Granma. Cuba.
- Ruiz, S. 2010. Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en biotecnología de la reproducción. *Cría y salud*, n° 31, 58-63.
- Rust, J.M., D.S. Visser, J.E. Venter, M.P. Boshoff, S. Foss and J.P. Greyling. 2009. The effect of season on aspects of in vitro embryo production in sub-

- fertile beef cows. South African Journal of Animal Science, 39 (Supplement 1).
- Scott, C. A., L. Robertson, R.T. de Moura, C. Paterson and J.S. Boyd. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. Vet Rec; 134: 440-443.
- SENAMHI. 2016. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología
- Sendag, S., Y. Cetin, A. Muhammet, H. Klaus-Gerd and N. Heiner. 2008. "Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. "Animal Reproduction Science; 106; pp 208-214.
- Seneda, M., C. Esper, J. Garcia, E. Andrade, M. Binelli, J. Oliveira and A. Nascimento. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. Theriogenology 59, 1435-1440.
- Seneda, M., C. R. Esper, J. M. Garcia, J. A. Oliveira and R. Vantini. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. Animal Reproduction Science 67, 37-43.
- Sharma, R.K. 2000. Follicular atresia in goat: A review. Indian J Anim Sci 70: 1035-1046 Universidad e Estadual Paulista. Botucatu.
- Sisson, S., J.D. Grossman y R. Getty. 2005. Anatomía de los animales domesticos.
- Sorensen, A.M. 1991. Reproducción Animal Principios y Prácticas. Mc graw Hill.
- Squires, E.J. 2003. Applied animal endocrinology, CABI International Publishing. USA.
- Stroud, B. 2011. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farmanimals. Embryo Transfer Newsletter 29: 14-24.
- Sunderland, S. J., P. G. Knight, M. P. Boland, J. F. Roche and J. J. Ireland. 1996. Alteration in intrafollicular levels of deferent molecular mass forms of inhibin during development of follicular and luteal phase dominant

follicles heifers. En: Biology of reproduction, abstract. Vol. 54, No 2. p. 453 – 462.

Van Den Hurk R and J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717–1751.

Van Wagtendonk, A. M. 2006. "Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status." *Science Direct; Theriogenology* 65; pag 914–925.

Vivanco, W. 2002. Mejoramiento genético bovino a través de tecnologías reproductivas de avanzada, III seminario internacional, competitividad en leche y carne, Medellín, p. 227-247.

Ward, F.A., P. Lonergan, B.P. Enright, M.P. Boland. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocyte for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technologic. *Theriogenology* 54:33-46.

Zeitoun, M.M., H.F. Rodriguez, and R.D. Randel. 1996. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology* 45, 1577-1581.

ANEXOS

ANEXO A FORMATO

FORMATO PARA ASPIRACION FOLICULAR EN VACAS

DÍA Y FECHA	OVARIO		N° DE PUNCIONES	N° DE OVOCITOS OBTENIDOS	CLASIFICACION DE OVOCITOS	OBSERVACIONES
	IZQUIERDO	DERECHO				
14/06/18 Vaca 01 896			-	-	-	- Impresión a la colocación de lidocaína.
Vaca 762 JUANA 24/02/18			OI = 1 2 OD = 1	-	-	- Vaca en producción porque no ovula. - Anovulatorio por eso tiene folículos grandes.
21/06/18 Vaca 01 498 (CARMEN San Juan)			3 J J D	1	Imagen en USB D	ojo por esos los casos de 7 días.
Vaca 01 770 21/06/18			3	1	Imagen en USB D	- Vaca en celo. - Ed. ovu no interrumpe actividad del celo. - CL ovario 12
Vaca 03 896 SAN JUAN 21/06/18			1	1	Cellular cámara imagen. A Células muy apreciable.	- OI folículo quístico. - foto dos medidos el otro mal medido. en el CL. - 2 folículos pequeños no aspirados.

Imagen 01. Formato para aspiración folicular en vacas

VACAS PARA ASPIRACION FOLICULAR CHUQUIBAMBILLA

VACA	896 (san juan)		762 Juana (establo)		998 Carmen (san juan)		770 (san juan)	
	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO
1								
ASPIRACIONES								
1								
OVARIO								
FOLICULOS	5,5,5,7mm	5,5,6,8mm.	3,7,9mm	14mm.	6,6,7,8mm	5,5,8mm.	3,4,8mm.	10,12,14mm. 4mm.
PUNCIONES	1	2	1	1	4	2	1	3
OVOCITOS					1 ovocito con mb. rota. 1 ovocito degenerado.		1 ovocito cat. "C"	
OBSERVACIONES			-Ovario derecho, folículo quístico 14mm.		-Ovocito con mb dañada por exceso de aspiración.		- ovocito desmenuado.	
2								
OVARIO								
FOLICULOS	4,4,5,8mm	4,4,6mm.	3,13mm	18mm.	6.0,4.7,8.2 5.6mm.	4.1,6.2mm. 3.3mm.	3.5mm. 2.8,3.7	5.2,5.5,6.4 4.1mm.
PUNCIONES	2	1	1	1	3	1		3
OVOCITOS	-CL. 11mm.				1 ovocito cat. "D"			
OBSERVACIONES	- Impresión en la anestesia epidural.		- Vaca en producción porque no ovula. - Anovulatorio por eso foli quísticos.					- Vaca en celo, el ovu no interrumpe actividad del celo. - CL ovario 12.
3								
OVARIO								
FOLICULOS	6,13mm.	2, 2. mm.	3,2,3.7,3.4 4.1,6.2mm	3,3,11mm. 10mm.	3.7,3.9,4.6 4.8,9.2mm.	3.1,2.4,2.6 2.7,2.9.	4.7,5.1,2.2 3.5mm.	5.4,4.3,4.1 3.8mm.
PUNCIONES	1	Corpo loto. 2,2mm.	2	2	CL. 1		2	1
OVOCITOS	1 ovocito cat. "Δ"		1 ovocito cat. "Δ"					1 D
OBSERVACIONES	- CL 10mm. ov.		- Vaca ardida. - CL OD 18mm.		OI: folículos < 3mm.			Folículo < 3mm, - No se puede epidural

Imagen 02. Formato general de aspiración folicular Chuquibambilla

ANEXO B TABLAS

Tabla 4. Datos generales de conteo de folículos y n° de ovocitos recuperados por punciones

N° vaca	N° rep.	< 5mm	≥5 - <10 mm	≥ 10mm	Punci-ones	ovocitos	Observaciones
896	1	-	IIIIIIII	-	3	-	CL 11mm OI
	2	IIII	III	-	3	-	
	3	II	I	I	1	1 A	
	4	IIIIIIIIII	I	I	2	-	
	5	IIIIII	I	I	2	-	
	6	I	IIIIIIII	I	4	1 A	
Σ folículos 47		22/47	21/47	4/47	15	2 A	
%		46.8	44.6	8.5			
762	1	I	II	I	2	-	Fol. quístico OD
	2	I	-	II	2	-	
	3	IIIIII	I	II	4	1 A	
	4	III	III	-	3	-	CL 18mm
	5	III	III	-	2	-	
	6	IIII	IIIIII	I	6	2 B	
Σ folículos 38		18/38	14/38	6/38	19	3	
%		47.3	36.8	15.8			
998	1	-	IIIIIIII	-	6	2 D	Ovocito con mb. Dañada
	2	III	IIII	-	4	1 D	
	3	IIIIIIIIII	I	-	1	-	
	4	IIIIII	I	II	3	1 D	
	5	IIIIII	II	-	1	-	CL 19mm OD
	6	IIIIII	IIII	-	5	1 B	
Σ folículos 50		28/50	20/50	2/50	20	5	
%		56.0	40.0	4.0			
770	1	III	I	III	4	1 C	
	2	IIIIII	III	-	3	-	
	3	IIIIII	II	-	3	1 D	
	4	IIIIIIII	II	I	1	1 C	
	5	IIIIII	III	-	4	1 D	
	6	IIIIII	II	-	3		
Σ folículos 49		32/49	13/49	4/49	18	4	
%		65.3	26.5	8.2			

Tabla 5. Número y porcentaje de folículos visualizados según tamaño (mm)

N° VACA	Sesiones	< 5mm (%)	≥5 - <10 mm (%)	≥ 10mm (%)	Total folículos
896	6	22 (46.8)	21 (44.6)	4 (8.5)	47
762	6	18 (47.3)	14 (36.8)	6 (15.8)	38
998	6	28 (56.0)	20 (40.0)	2 (4.0)	50
770	6	32 (65.3)	13 (26.5)	4 (8.2)	49
TOTAL		100	68	16	184
%		(54.3)	(37.0)	(8.7)	

ANEXO C FIGURAS



Figura 12. Materiales utilizados para la adecuación de un equipo de aspiración

siendo las letras: (A) transductor endovaginal humano; (B) mango para OPU; (C) guiador; (D) guía de aguja; (E) línea de aspiración; (F) agujas de aspiración; (G) tubo recolector; (H) tapón de vacío; (I) bomba de vacío

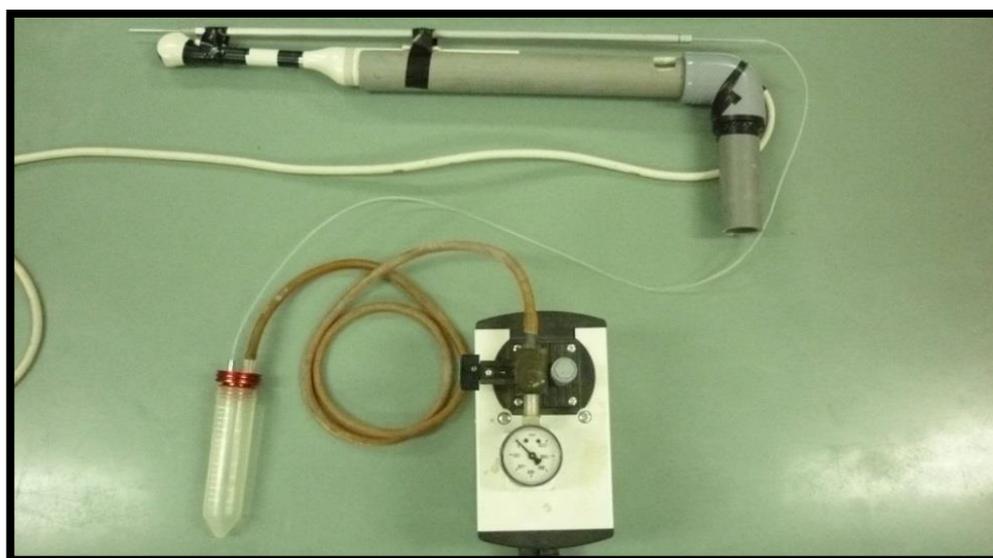


Figura 13. Armado completo de un equipo de aspiración folicular

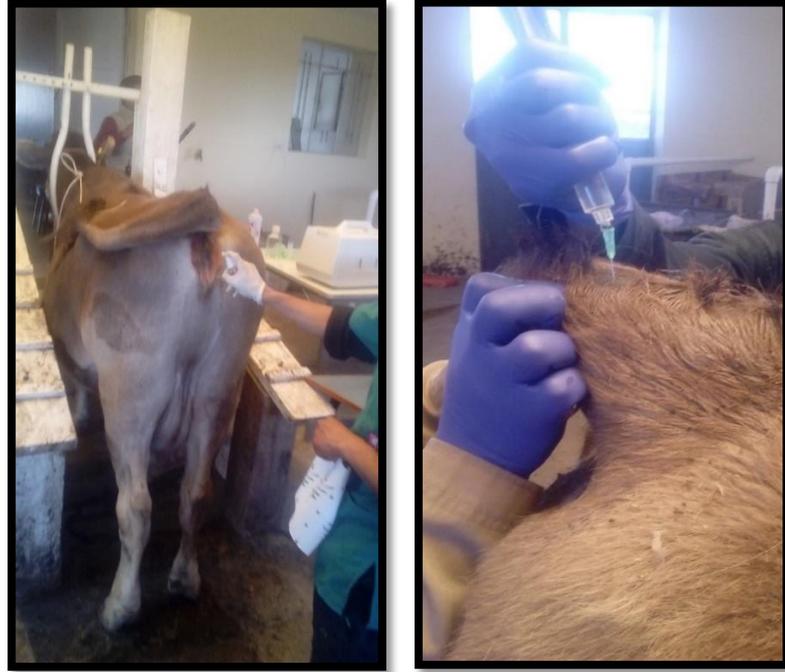


Figura 14. Ingreso al brete, desinfección de toda la zona perianal y vulva, colocación anestesia epidural



Figura 15. Aspirador con funda de plástico



Figura 16. Introducción del aspirador folicular

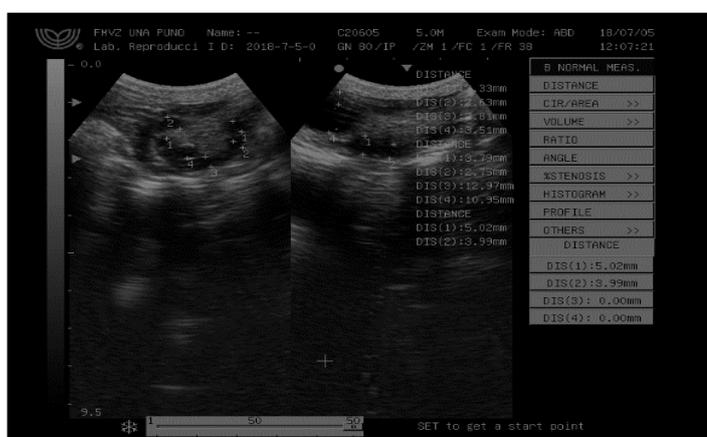


Figura 17. Ubicación y medición de folículos



Figura 18. Introducción de la aguja de aspiración por el tubo guidador



Figura 19. Líquido aspirado

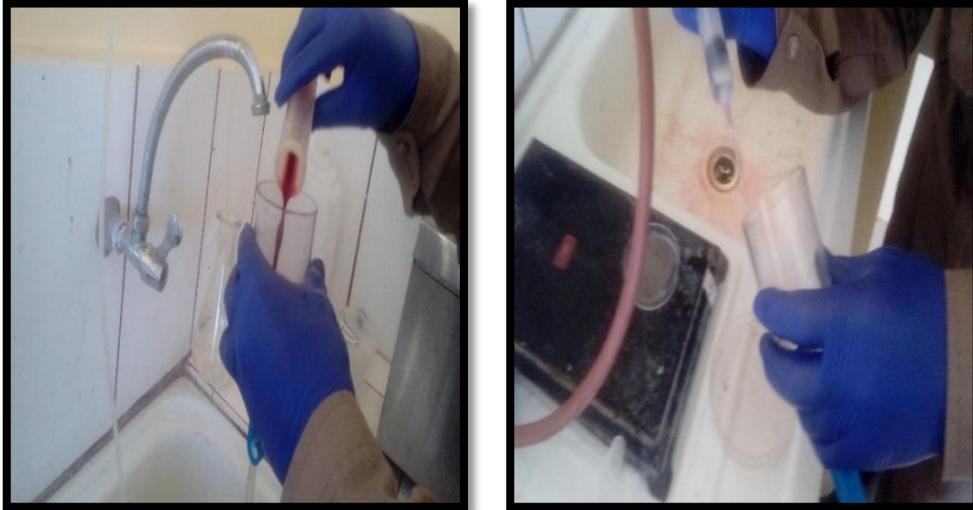


Figura 20. Filtrado y lavado de los ovocitos

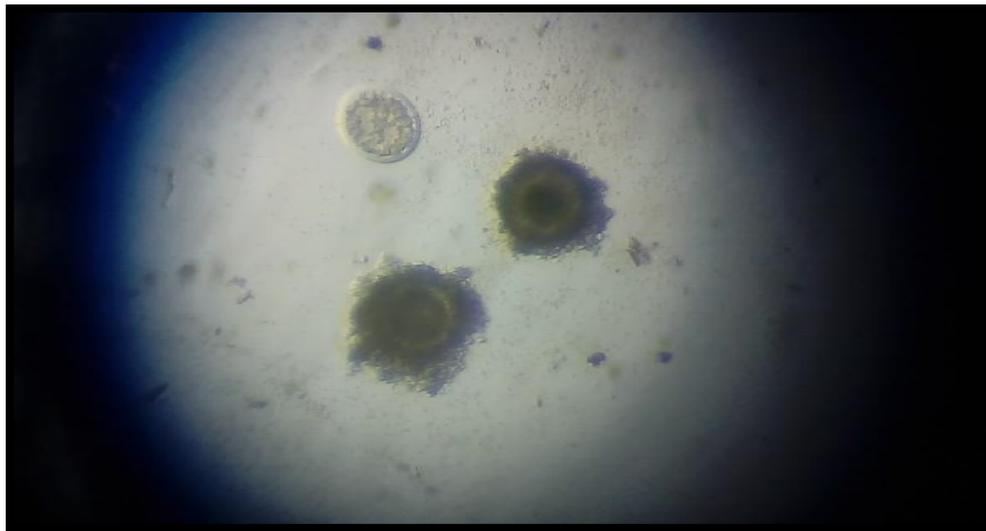


Figura 21. Clasificación de ovocitos

ANEXO D ESTADISTICO

CHI CUADRADO PARA TASA DE RECUPERACIÓN

```
> Table<- matrix(c (2, 13, 3, 16, 5, 15, 4, 14), 4, 2, by row = TRUE)
>dim names (.Table) <- list ("rows"=c ("vaca 1", "vaca 2", "vaca 3", "vaca 4"), "columns"=c ("folículos aspirados", "Ovocitos recuperados"))
```

Vaca	folículos aspirados	% tasa recuperación	% tasa-100	%
vaca 1	15	13.3	86.7	100
vaca 2	19	15.8	84.2	100
vaca 3	20	25.0	75.0	100
vaca 4	18	22.2	77.8	100

```
> .Test<- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
> .Test Pearson's Chi-squared test Datos:Tabla
```

X-cuadrado = 1.0024, df = 3, p-value = 0.8007

```
> .prueba esperada - conteo esperado
```

Vaca	Folículos aspirados	Ovocitos recuperados
vaca 1	2.916667	12.08333
vaca 2	3.694444	15.30556
vaca 3	3.888889	16.11111
vaca 4	3.500000	14.50000

```
>round (.Test$residuals^2, 2) # Chi-square Components
```

	Folículos aspirados	Ovocitos recuperados
Vaca 1	0.29	0.07
Vaca 2	0.13	0.03
Vaca 3	0.32	0.08
Vaca 4	0.07	0.02

CHI CUADRADO PARA CATEGORÍA DE OVOCITOS RECUPERADOS

```
> .Table<- matrix(c(2,0,0,0,1,2,0,0,0,1,0,4,0,0,2,2), 4, 4, by row=TRUE)
>dim names (.Table) <- list ("rows"=c("vaca 1", "vaca 2", "vaca 3", "vaca 4"), "columns"=c("A", "B", "C", "D"))
```

	A	B	C	D
vaca 1	2	0	0	0
vaca 2	1	2	0	0
vaca 3	0	1	0	4
vaca 4	0	0	2	2

	A	B	C	D	%	Ovocitos
vaca 1	100.0	0.0	0	0	100	2
vaca 2	33.3	66.7	0	0	100	3
vaca 3	0.0	20.0	0	80	100	5
vaca 4	0.0	0.0	50	50	100	4

```
> .Test<- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
> .Test Pearson's Chi-squared test >Datos: Tabla
X-squared = 20.844, df = 9, p-value = 0.01336
> Prueba esperada # conteo esperado.
```

	A	B	C	D
Vaca 1	0.4285714	0.4285714	0.2857143	0.8571429
Vaca 2	0.6428571	0.6428571	0.4285714	1.2857143
Vaca 3	1.0714286	1.0714286	0.7142857	2.1428571
Vaca 4	0.8571429	0.8571429	0.5714286	1.7142857

```
>Round(.Test$residuals^2, 2) # Chi-square Components
```