



Alana y sus crías fotografía cortesía: @ganaderiasanrafael

# Evolución de la *aspiración folicular* para producción *in vitro* de embriones

Álvarez-Gallardo Horacio\*1 ID, Urbán-Duarte David1 ID, Estrada-Cortés Eliab2 ID, Villaseñor-González Fernando2 ID, Velázquez-Roque Adriana3 ID  
 Artículo publicado en: Abanico veterinario E-  
 abanicoveterinario@gmail.com <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario>

**E**n la actualidad, la producción *in vitro* de embriones (*PIV*) y la *transferencia de embriones (TE)* han tenido un gran impacto en la producción animal. En el caso del ganado bovino la *PIV* es ampliamente aplicada y la gran mayoría de los embriones producidos a nivel mundial son generados por esta tecnología de acuerdo con los datos reportados por la *Sociedad Internacional de Tecnologías Embrionarias (IETS)* (Viana, 2021).

Una de las razones de la amplia aplicación de la *PIV* en bovinos, respecto a otras especies, es el avance en otras tecnologías reproductivas como la *aspiración folicular (de*

*complejos cúmulo-ovocito a partir de foliculos de 2-8 mm)* la cual ha permitido la colección repetida y eficiente de ovocitos inmaduros a partir de donadoras vivas (Galli et al., 2001) sin afectar el bienestar animal de las mismas (Chastant-Maillard et al., 2003; Petyim et al., 2007; Currin et al., 2017). Es importante resaltar que existen reportes de programas con dos sesiones de *ovum pick up (OPU)* por donadora por semana (Petyim et al., 2003), lo que permite maximizar el potencial genético de las donadoras (Pontes et al., 2011).

La *PIV* requiere de varias técnicas como la *colección de ovocitos de las donadoras, la maduración in vitro,*

*la fertilización in vitro* y *cultivo in vitro* hasta la producción de embriones en la etapa de blastocisto (Galli et al., 2001; Tamassia et al., 2003). La *colección de ovocitos* se puede realizar mediante *aspiración folicular* guiada por ultrasonido (*OPU*) en especies mayores como los bovinos o por aspiración folicular vía laparoscópica (*LOPU*) en pequeños ruminantes (*ovinos, caprinos, cérvidos y becerras*) (Baldassarre, 2021). Ambas tecnologías, tienen como principal objetivo la colecta de ovocitos (*principalmente inmaduros*) de donadoras genéticamente superiores para que sean fertilizados *in vitro* con sementales élite y generar embriones, los cuales puedan ser transferidos en

Tabla 1. Producción *in vivo* e *in vitro* de embriones bovinos transferibles durante 2020, por región

(Viana, 2021)							
Región	África	Asia	Europa	Norte América	Oceanía	Sudamérica	Total
IVD	2,763	0	126,491	196,704	4,211	31,559	<b>361,728</b>
IVP	4,977	0	47,470	578,995	14,345	500,397	<b>1,156,422</b>

IVD: embriones producidos *in vivo*  
IVP: embriones producidos *in vitro*

receptoras previamente sincronizadas (Merton et al., 2003). Sin embargo, también pueden ser utilizadas con fines de conservación y/o rescate genético (Ruiz et al., 2013; Baldassarre, 2021). Estas técnicas de *aspiración folicular* son poco invasivas y la recuperación repetida de ovocitos de las donantes permite hacer múltiples cruzamientos, así como reducir el intervalo generacional en programas de mejoramiento genético, produciendo más embriones y preñeces por donadora que por la técnica de *multiovolación* y *producción in vivo de embriones (DIV)* (Merton et al., 2003; Baldassarre et al., 2007).

## Generalidades de la técnica OPU

El sistema *OPU* se compone de tres partes: un ultrasonido con transductor lineal (*rectal*) o micro convexo (5-7.5 MHz) asociado a un dispositivo para su fijación (*pistola de aspiración*), una bomba de aspiración y una aguja conectada al sistema de aspiración (Bols et al., 1996). Para la *aspiración folicular*, se requiere de *transductores* que incrementen la resolución y el tamaño de las imágenes para una mejor manipulación de los ovarios (Ginther, 2014). El transductor microconvexo es el más utilizado, cuenta con un campo ultrasonográfico de 150°, puede ser de 5-7.5 MHz, prefiriéndose el de 7.5 MHz, ya que tiene mejor resolución y permite localizar más fácil los folículos pequeños. El campo ultrasonográfico de 150° ayuda a facilitar la manipulación de los ovarios y a ubicar los folículos en la línea de punción, lo que permite el uso de agujas más cortas que entran directamente en el campo ecográfico, sin perder porciones utilizables de la aguja (Ginther, 2014). La aguja se adhiere y dirige al campo ecográfico a través de una guía que está conformada por un fino tubo

de acero inoxidable. Dentro del tubo de acero se encuentra la maniguera del sistema de aspiración, la cual se fija a la aguja y al tubo de acero a través de un tubo de silicona que, en conjunto con una pieza de conexión crean una estructura rígida que permite el movimiento de la aguja hacia adelante y hacia atrás, además de poder reemplazar fácilmente la aguja desafilada por una nueva (Palma, 2001).

El transductor y la guía de la aguja están insertados en la pistola de aspiración, la cual tiene un mango que le da la oportunidad al operador de fijar el dispositivo de *OPU* dentro de la vagina, presionando suavemente el mango con la mano derecha, dejando la mano izquierda libre para manipular el ovario (Palma, 2001). Las vacas utilizadas para *OPU* deben estar inmovilizadas y/o pueden ser sedadas en caso de ser necesario. Las heces se remueven del recto durante la palpación y se realiza anestesia epidural con lidocaína al 2 % para evitar molestia al animal y movimientos del recto durante el procedimiento. La vulva y el periné se limpian y desinfectan antes de introducir el dispositivo de *OPU*. El dispositivo tiene un mango mediante el cual puede ser manipulado con una mano fuera de la vaca. La cabeza del transductor se fija en posición cráneo dorsal en el fondo de la vagina, por encima del cérvix (Palma, 2001).

## Aspectos técnicos

Después del desarrollo inicial de la técnica, se han realizado diversos estudios para mejorar las técnicas de *aspiración folicular*, las cuales actualmente se utilizan ampliamente como herramienta reproductiva

para los programas de mejoramiento genético. Entre los principales aspectos técnicos sobre los que se ha trabajado son el *tipo de aguja*, el *tipo de bisel*, la *presión de vacío* y el *tipo de transductor* (Bols et al., 1996; Bols et al., 1997; Palma, 2001; Van Wagten-donk-de Leeuw, 2006).

## Tipo de aguja

En lo referente al tipo de aguja, se ha evaluado el calibre de la aguja utilizando agujas de 18G, 19G y 21G, observándose que el diámetro con el que se tiene mayor recuperación es el de 18G. Sin embargo, esto es relativo, ya que la presión de aspiración tiene mayor influencia en la cantidad e integridad de los ovocitos recuperados (Bols et al., 1996). En un inicio se usaban agujas largas, de 50 a 65 centímetros, con un diámetro externo de 1- 1.5 mm y bisel corto (Bols et al., 1997). La mayor desventaja de las agujas largas es que se desafilan rápidamente y requieren ser afiladas, pero no alcanzan el estado inicial de filo, esto cobra importancia ya que el filo de la aguja es esencial para que la técnica sea exitosa (Bols et al., 1996). Estas agujas largas son costosas y presentan un gran espacio muerto en la luz de estas, quedando los ovocitos en un ambiente desfavorable por un largo período, además se necesitan grandes cantidades de medio para limpiarlas (Palma, 2001).

La simplificación de los dispositivos utilizados para *OPU* para el uso de agujas desechables abrió un nuevo panorama para la técnica, ya que una aguja desafilada puede ser fácilmente cambiada debido a que son de bajo precio. Diferentes diámetros y largo de agujas desechables estériles están disponibles en el mercado. El espacio muerto es mínimo, por lo que los ovocitos pueden ser recuperados bajo condiciones más favorables (Bols et al., 1997). Se reduce el riesgo de contaminación entre una donadora y otra, además de que se minimiza el tiempo en que los complejos cumulus

ovocitos (COCs) se encuentran en un ambiente desfavorable (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006).

## Tipo de bisel

Otro aspecto estudiado fue la influencia del tipo de bisel, corto o largo, sobre la recuperación de ovocitos. Aunque se observó una recuperación similar para ambos tipos de bisel, se encontró que la presión de aspiración afecta de manera significativa la recuperación y la integridad de los ovocitos cuando se usan agujas con bisel corto (Bols et al., 1997). En la actualidad existen agujas comerciales para OPU, las cuales tienen una extensión que se conecta directamente con la línea de aspiración.

## Presión de vacío

En cuanto a la presión de vacío, se ha observado que ésta varía de acuerdo con el tipo de aguja y bisel que se utilice, sin embargo, se encontró que a mayor presión hay mayor recuperación de ovocitos, pero también se incrementa el número de ovocitos desnudos (Palma, 2001). Para las agujas desechables, la presión de aspiración recomendada va de 70 a 130 mm Hg, ya que al reducir la presión de vacío se incrementa la integridad de los COCs y esto aumenta la producción de blastocistos (Bols et al., 1996; Bols et al., 1997).

## Tipo de transductor

Desde 1984, cuando se generaron los primeros reportes de evaluación reproductiva en bovinos (Reeves et al., 1984; Pierson & Ginther., 1984), la *ultrasonografía transrectal* se ha convertido en una herramienta básica en reproducción bovina (Ginther et al., 2014), debido a esto, en un inicio se trató de utilizar un transductor lineal rectal, esto debido a que la gran mayoría de los profesionales en el área de reproducción en grandes especies, cuentan con un ultrasonido con transductor lineal rectal

(Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Cuando se comparó el uso de un transductor lineal con un transductor microconvexo, se observó que no hubo diferencias para detectar los folículos grandes (5 mm) hubo una disminución de 12% en la visualización con el transductor lineal. En cuanto a la recuperación de ovocitos, con el transductor microconvexo se duplicó la recuperación con respecto al transductor lineal, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Bols et al., 2004). Esta diferencia se debe a que el área para manipular el ovario para realizar la punción es mayor con el transductor microconvexo comparado con el transductor lineal.

En la actualidad la mayoría de los dispositivos utilizan un transductor microconvexo (Xavier et al., 2023; Camargo et al., 2019; de Carvalho et al., 2019), incluso existe un transductor microconvexo ajustado a la forma para el dispositivo de OPU.

## Aspectos biológicos

Entre los aspectos biológicos relacionados a la técnica de OPU se encuentran el genotipo del animal, la estimulación ovárica, el tiempo y frecuencia de la OPU, la respuesta individual de la donadora, estado fisiológico de la donadora (*vacial/gestante; lactante/no lactante*), edad de la donadora (*vaca, vaquilla, becerra*), época del año y la experiencia del técnico para realizar la OPU (Palma, 2001; Tamassia et al., 2003; Camargo et al., 2005; Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006; Takuma et al., 2010; Vieira et al., 2014). La estimulación hormonal es sin duda una de las mejoras más importantes con respecto a la calidad del ovocito y la producción de blastocistos *in vitro*.

Adicionalmente, el uso de hormonas para la estimulación folicular es una ventaja que tiene la OPU-PIV sobre la DIV. Se puede utilizar hormona folículo estimulante (FSH) y gonadotropina coriónica equina (eCG) para la estimulación folicular

(Aller et al., 2012) y aunque esta práctica se hace principalmente en ganado *Bos taurus* (Presicce et al., 2011; Aller et al., 2012; Chasombat et al., 2013; Vieira et al., 2014), también se han visto buenos resultados al aplicarla en ganado *Bos indicus*. No obstante, también se han observado programas de PIV de gran escala con ganado *Bos indicus* (Nelore) en los que no se estimuló a las donadoras y se tuvo una producción eficiente de embriones (Pontes et al., 2011).

Por otra parte, con el fin de hacer programas intensivos de producción de embriones, se han combinado la PIV con la DIV, donde se han obtenido buenos resultados (5.1 embriones por lavado y 3.2 embriones congelables) al iniciar la superovulación 2 días después de haber realizado la OPU utilizando donadoras Nelore (Surjus et al., 2014). Por otra parte, el genotipo de las donadoras tiene mucho que ver con la población folicular. Se sabe que las donadoras *Bos indicus* superan de 2 a 4 veces las cantidades de ovocitos colectados por OPU en comparación con las donadoras *Bos taurus* (Baruselli et al., 2015). Se ha observado también que las donadoras *Bos indicus* tienen más oleadas foliculares y una mayor población de folículos antrales mayores a 5 mm de diámetro en comparación con las *Bos taurus* (Silva-Santos et al., 2011).

En cuanto a las estrategias para incrementar la PIV, se ha demostrado que los ovocitos madurados *in vivo* son más competentes comparados con aquellos madurados *in vitro* (Van de Leemput et al., 1999; Camargo et al., 2019). En 1994 se reportó que los ovocitos bovinos aspirados de folículos dominantes antes del pico de la hormona luteinizante (LH) muestran alteraciones en su morfología nuclear y citoplasmática que, de acuerdo con los autores, son un prerrequisito para la adquisición de su competencia completa.

En un trabajo realizado en 2014, se lograron obtener 54.9% de blastocistos con semen sexado en ganado

*Holstein*, a partir de ovocitos madurados *in vivo* y sincronización de la oleada folicular mediante ablación del folículo dominante (Matoba et al., 2014). En 2019, al trabajar la PIV en ganado *Black Japanese*, se llegó a la conclusión de que se pueden generar embriones de mayor calidad y de manera eficiente cuando se utilizan ovocitos madurados *in vivo* colectados por OPU comparado con ovocitos inmaduros (Egashira et al., 2019).

Entre las estrategias de selección de donadoras de ovocitos para la PIV, está la evaluación de los niveles plasmáticos de hormona antimülleriana (AMH). Las donadoras clasificadas como con altos niveles de AMH produjeron mayor número de embriones por OPU comparadas con las clasificadas como con bajos niveles de AMH, independientemente de si eran *Bos taurus* o *Bos indicus*. Con estos resultados se concluyó que los niveles plasmáticos de AMH son un

acertado marcador endócrino para la selección de donadoras de ovocitos (Guerreiro et al., 2014).

En la actualidad, la *ultrasonografía Doppler Color* ha tenido múltiples aplicaciones en la evaluación reproductiva del ganado bovino. Se sabe que la irrigación ovárica es muy importante para la protección y formación de los ovocitos (*barrera hemato-folicular*), para la formación de fluido folicular y el transporte de nutrientes (Da Broi et al., 2018). Recientemente se ha encontrado que la irrigación ovárica juega un papel muy importante en la PIV, se ha observado que los ovarios de donadoras de ovocitos con una irrigación entre el 50 y 70% aproximadamente, producen mayor cantidad de embriones que las donadoras con irrigación ovárica de alrededor del 30%. En este trabajo se observó que las donadoras con irrigación ovárica de ~70% tuvieron una producción de blastocistos del

38%, por su parte las donadoras con irrigación de ~50% produjeron 30% de blastocistos y las de irrigación de ~30% produjeron 18% de blastocistos (VillaseñorGonzález et al., 2021).

## Transferencia intrafolicular de ovocitos (IFOT)

### Antecedentes

Aunque la *transferencia intrafolicular de ovocitos (IFOT)* no es una técnica reciente, se ha reportado desde 1985 en primates, en ganado bovino (Fleming et al., 1985) y en los noventa en equinos (Hinrichs & DiGiorgio, 1991). En la actualidad, está asociada a las nuevas biotecnologías. Esta técnica consiste en la transferencia de ovocitos heterólogos en el folículo preovulatorio de una hembra previamente inseminada. Esta técnica fue perfeccionada en la década de los 90s mediante el uso



**TRACTORES KUBOTA**  
**EL MEJOR ALIADO**  
PARA PRODUCCIONES GANADERAS



Los tractores Kubota son ideales para trabajar en terrenos difíciles. brindan la fuerza y potencia necesarias para condiciones de trabajo duro.

Comuníquese vía WhatsApp  
**321 498 6030**  
ingrese a [www.motomart.com.co](http://www.motomart.com.co)



Tabla 2. Resumen del avance en la técnica de aspiración folicular en ganado bovino.

Uso de hormonas para estimular	Aguja L = larga C = corta	Presión mmHg	Transductor	No. Ovocitos <sup>a</sup>	Recuperación (%) <sup>b</sup>	Ovocitos viables (%) <sup>c</sup>	Embriones viables <sup>*d</sup>	Referencia
<i>Bos taurus</i>								
No	23G L	-	Vaginal	13.0	50.4	-	2.2	Pieterse et al., 1991
No	20G L	40-50	Vaginal	8.0	55.1	77.61	1.0	Kruij et al., 1994
FSH 24-30 mg	17G L	75-100	Convexo	8.6	69.9	-	1.3	Looney et al., 1994
FSH 75 UI	17G L	70	Vaginal	9.5	-	80.0	2.7	Rocha et al., 1998
No	20G C	50	Vaginal	3.9	58.5	86.0	-	Petyim et al., 2003
No	19G C	-	Lineal	0.9	9.2	73.0	-	Bols et al., 2004
No	19G C	-	Convexo	11.4	-	70.1	2.1	Pontes et al., 2010
eCG 1600 UI	20G C	65	Vaginal	2.2	34.2	73.8	-	Aller et al., 2012
FSH 200 mg	20G C	85-90	Convexo	9.9	61.1	83.9	4.4	Vieira et al. 2014
No	20G C	68	Convexo	17.3	81.8	71.1	3.0	Guerreiro et al., 2014
No	20G C	60-70	Convexo	14.6	60.4	74.1	0.7	Sales et al., 2015
No	20G C	68	Convexo	9.2	36.9	51.08	0.5	Batista et al., 2016
No	18G C	90	Convexo	6.3	-	71.2	5.2	Oliveira et al., 2019
FSH 70 UI	18G C	70	-	26.4	64.6	96.5	7.1	Simmons et al., 2023
<i>Bos indicus</i>								
FSH 75 UI	17G L	70	Vaginal	10.3	-	83.3	5.4	Rocha et al., 1998
No	20G C	80	Vaginal	8.9	61.3	74.1	1.1	Viana et al., 2004
No	20G C	80	Vaginal	7.0	69.3	62.1	-	Viana et al., 2010
No	19G C	-	Convexo	17.1	-	70.1	3.2	Pontes et al., 2010
FSH 100 mg	17G L	120	Vaginal	20.8	91.6	64.4	6.8	Chasombat et al., 2013
No	20G C	68	Convexo	45.3	77.5	50.7	7.0	Guerreiro et al., 2014
No	20G C	60-70	Convexo	22.8	88.8	84.9	3.8	Sales et al., 2015
No	20G C	68	Convexo	29.9	63.6	60.5	9.3	Batista et al., 2016
No	18G C	90	Convexo	10.0	-	78.8	10.2	Oliveira et al., 2019
No	18G C	60-80	Convexo	30.1	-	85.7	10.3	García et al., 2020
No	20G C	90-100	Convexo	58.6	78.3	74.2	9.7	de Silva et al. 2022
No	20G C	80	Convexo	24.7	88.4	78.7	9.6	Xavier et al., 2023
* No. de ovocitos recuperados sobre el No. de foliculos aspirados								
** No. de ovocitos viables sobre el No. de ovocitos recuperados								
*** No. de embriones viables por aspiración								

de la *ultrasonografía transvaginal* en la reproducción de ganado bovino, equino y en humanos (Kassens et al., 2015). La aplicación de esta técnica surge en el caso del ganado bovino como una alternativa a la *PIV* para producir embriones que tengan mayor criotolerancia (Kassens et al., 2015). Además, evitar la necesidad del equipamiento de un laboratorio para *PIV* (Sprícigo et al., 2016). Con esta técnica, se sustituyen las incubadoras por el útero de la receptora y la obtención de los embriones se realiza mediante la técnica transcervical de lavado uterino empleada en los protocolos tradicionales de colecta de embriones producidos *in vivo*. Con la *IFOT* se habían logrado generar embriones en ganado bovino y equinos, pero, no fue hasta 2015 cuando se reportaron las primeras crías nacidas a partir de embriones

generados por esta técnica, en la cual se usaron de ovocitos obtenidos de ovarios de rastro y madurados *in vitro* (Kassens et al., 2015). En la actualidad, existen más trabajos donde se obtuvieron crías vivas por *IFOT* a partir de ovocitos inmaduros (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017).

Esta técnica también se ha empleado para la *producción in vivo de embriones ovinos por IFOT* (Falchi et al., 2022). La *IFOT* se complementaría con la *LOPU* para la colección de ovocitos de donadoras alto valor genético, los cuales serían transferidos a receptoras (*animales comerciales*) para la producción *in vivo* de embriones, de esta forma los efectos adversos tales como adherencias no se presentarían en las donadoras y esto alargaría su vida útil. Es importante recalcar que, aunque esta tecnología es prometedora, todavía no

se alcanzan los resultados obtenidos con la *PIV* tradicional (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Falchi et al., 2022).

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos - INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México, 2 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Centro Altos de Jalisco - INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México, 3H&A Biotecnologías en Reproducción Animal, Tepatitlán, Jalisco, México. \*Autor responsable y de correspondencia: Álvarez-Gallardo Horacio. Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad # 400, Racho Las Cruces, CP. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. E-mail: alvarez.horacio@inifap.gob.mx, urban.david@inifap.gob.mx, estrada.eliab@inifap.gob.mx, villasenor.fernando@inifap.gob.mx, velazquezra0809@gmail.com