

Capítulo LXV

Logros y desafíos en la recuperación de ovocitos mediante aspiración folicular (OPU) en ganadería mestiza de Doble Propósito

Juan Carlos Gutiérrez Áñez
Rumualdo González Fernández

Los avances tecnológicos en las biotecnologías reproductivas, como las dirigidas a la producción de embriones bovinos mediante aspiración folicular, combinada con la fecundación *in vitro* (FIV) y uso de semen sexado, ofrecen como principal ventaja, la aceleración de manera exponencial del progreso genético de los rebaños (Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2006).

El impacto de la aplicación de estas biotecnologías en otras ganaderías tropicales especializadas, bien sea para la producción de leche (Gyr Lechero) o de carne (Brahman y Nellore) ha sido notorio. Los umbrales de mejoramiento alcanzados en estos sistemas se han logrado en pocas generaciones, lo que supone que estas biotecnologías al combinarse con programas de mejoramiento continuo, permiten obtener en menor tiempo un progreso genético importante. Desde el punto de vista metodológico, los logros y alcances en la obtención de ovocitos mediante la aspiración folicular (OPU) en el trópico en ganado *Bos indicus* (Gyr y Nellore) es un asunto de records en los últimos años (Pontes *et al.*, 2009; Viana *et al.*, 2010; Pontes *et al.*, 2011).

El presente capítulo tiene como objetivo definir y describir la metodología de la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU), así como indicar los equipamientos necesarios. Del mismo modo, se presentan algunos resultados de las investigaciones realizadas en ganado *Bos indicus* (Gyr, Brahman) y mestizos doble propósito *Bos indicus* × *Bos taurus* (Brahman-Holstein, Gyr-Holstein, entre otros cruces); con el fin de evaluar el potencial que esta biotecnología tiene para el mejoramiento de la ganadería mestiza de Doble Propósito. Finalmente, se establecen los principales retos y desafíos que tiene la ganadería mestiza de doble propósito para la implementación de esta biotecnología.

DEFINICIÓN Y OBJETIVO DE LA OPU

La aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido para la recolección de oocitos, abreviada como “OPU” tomada de su denominación en inglés “Ovum Pick up”, fue una técnica desarrollada originalmente en la reproducción asistida en humanos (Gleichert *et al.*, 1983); la cual posteriormente fue adoptada en el ganado bovino en Holanda a finales de los años 80 (Callesen *et al.*, 1987; Pieterse *et al.*, 1988).

El empleo de la OPU de forma rutinaria en la reproducción asistida veterinaria, se inicia en 1994 utilizando donantes vivas para recolectar los ovocitos de manera repetida tanto en novillas seleccionadas como en vacas de alto mérito genético (Kruip *et al.*, 1994). El objetivo y la razón principal es producir gran cantidad de terneros con cualidades productivas conocidas y acortar el intervalo generacional en los programas de producción ganadera. Por otro lado, Pieterse *et al.*, 1988 indicaron que el objetivo principal es producir más embriones y más preñeces por vaca donante, que los logrados por medio de la superovulación en los programas convencionales conocidos de transferencia de embriones.

Otro aspecto importante de la técnica de OPU es que se trata de una biotecnología que puede ser usada en vacas en distintos estados fisiológicos: cíclicas, no cíclicas, preñadas durante el primer tercio de la gestación y en aquellas que no responden a estímulos hormonales en programas de ovulación múltiple. También puede ser aplicada en animales viejos con desórdenes reproductivos de origen no genético, así como en terneras y novillas pre-púberes a partir del 6^{to}-8^{vo} mes de edad, lo que acorta el intervalo generacional de manera drástica (De Ondiz & Ruiz-López, 2011).

Ya se ha comentado que una de las principales ventajas de la OPU incluye la maximización del potencial reproductivo de vacas élites o genéticamente superiores. Mediante la OPU y su combinación con la FIV, una hembra bajo reproducción natural o inseminación artificial puede pasar de producir una cría al año, a producir en promedio 36 a 50 crías en el mismo lapso de tiempo en condiciones ideales (Pieterse *et al.*, 1988).

Por otra parte, la OPU representa un logro económico considerable del uso del semen, ya que con una población de $1-2 \times 10^6$ de espermatozoides (spz) se pueden fertilizar hasta 300 ovocitos (Palma, *et al.*, 2007). Este aspecto representa una ventaja económica considerable, principalmente con el semen de alto valor como el semen sexado, ya que con una sola dosis de semen de este tipo ($2,1 \times 10^6$ spz), se podrían fecundar los ovocitos colectados mediante OPU de varias vacas. De manera simple, podemos asumir que mediante la OPU y la FIV se puede lograr varias preñeces de diferentes donadoras con la misma dosis de semen sexado; en vez de 1/2 preñez en el mejor de los casos, si esa misma dosis de semen se utilizara para inseminar de manera convencional o bicornual un animal (Seidel, 2007; Seidel *et al.*, 2008).

La técnica OPU para la obtención de ovocitos (gameto femenino) consiste en el uso de un sistema de aspiración folicular guiado por ultrasonografía, como se explica a continuación.

TÉCNICA OPU DE ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA POR ULTRASONIDO

El sistema de OPU está formado por tres componentes principales: un equipo de ultrasonido con un transductor o sonda, una bomba de vacío para la aspiración y un sistema de guía unida a una aguja, la cual se encuentra conectada a un tubo recolector de ovocitos. Tanto el sistema de guía como la sonda de ultrasonido se encuentran acoplados para acceder a los ovarios a través de la vagina.

Para proceder a la aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU), las hembras deben ser inmovilizadas mediante un cepo o brete de sujeción. A continuación, se procede a la colocación de anestesia epidural alta con lidocaína al 2% hasta lograr la relajación del recto y la cola, con la finalidad de evitar la tensión y la presencia de heces durante la manipulación. Se procede a la higiene y desinfección de la vulva y del perineo antes de introducir el dispositivo de OPU, el cual contiene el transductor de ultrasonido y el sistema de guía de la aguja en la vagina. Para la OPU propiamente dicha se han utilizado procedimientos adaptados, previamente descritos (Seneda *et al.*, 2001; Bols, 2008; Pontes *et al.*, 2009), los cuales se describen a continuación.

La manipulación del dispositivo se realiza con una mano desde el exterior, a través de un mango rígido que se encuentra acoplado al transductor del ultrasonido y al sistema de guía de la aguja. La cabeza del transductor es fijada en posición cráneo-dorsal, sobre el lado derecho o izquierdo del cérvix, dependiendo del ovario que va a ser aspirado (Figura 1). Usando la otra mano introducida en el recto, se procede a manipular el ovario para posicionarlo contra la cabeza del transductor (Figura 2), de manera que se pueda visualizar el ovario y sus folículos en el monitor del equipo de ultrasonografía.

Los folículos son posicionados uno a uno sobre la línea de punción establecida en la pantalla, luego de la programación de ésta en el software que controla la imagen del equipo de ultrasonografía. La aspiración folicular se realiza lentamente mediante el movimiento en sentido craneal de la aguja para punccionar el folículo a través de la guía de aspiración. La guía de aspiración es controlada mediante el dedo índice y el dedo pulgar de la mano que sujeta el mango, a la vez que empuja el mango en sentido craneal (Figura 3); mientras la otra mano que sujeta el ovario posiciona a este sobre el cabezal del transductor (Figura 2).

Una vez aspirado el contenido folicular, los folículos colapsan y desaparecen de la pantalla. Los ovarios son aspirados en el sentido de las agujas del reloj ubicando los folículos presentes en ambas caras, bordes y polos mediante la rotación manual.

Los folículos visibles son punzados y los Complejo Ovocito-Cumulus (COCs) son aspirados utilizando agujas desechables, generalmente de 16-18-20G \times 1,70mm; la aguja permanecerá conectada a través de una sonda fina a un tubo cónico colector de 50mL. La aspiración folicular es realizada por medio una bomba de vacío con una presión negativa de 12-15mL/min o entre 60-80 mm de mercurio (mm Hg). El medio de colección utilizado es una solución salina fisiológica (0,9% de cloruro de sodio), suplementada con 5% de suero fetal bovino (SFB), 10 μ L/mL de sulfato de gentamicina y 5.000UI/L de heparina sódica para evitar la coagulación y empaquetamiento de los COCs. Durante el proceso de aspiración, el sistema es enjuagado repetidamente a fin de descartar la retención de

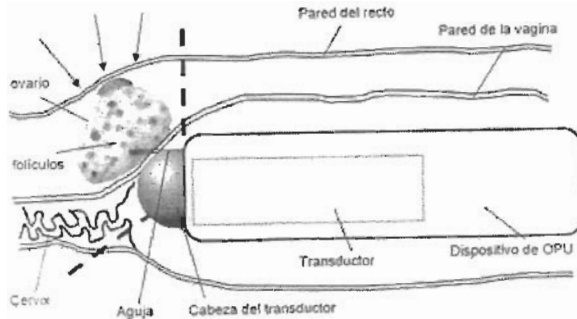


Figura 1. Esquema de la técnica de OPU. Ubicación del ovario durante la palpación transrectal. La presión es ejercida sobre el ovario con la mano en el recto, desde la dirección indicada por las flechas (Bols, 2008). Tomado de Palma (2008).

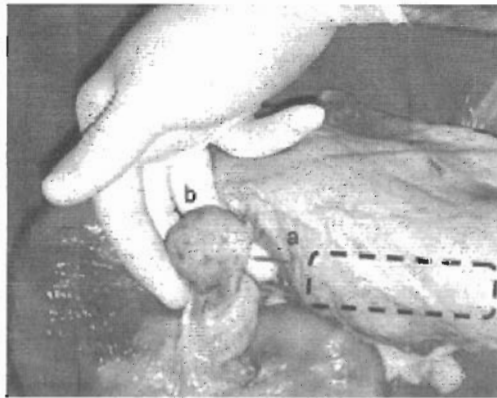


Figura 2. Representación esquemática del método de sujeción del ovario durante la sesión de OPU. Ubicación del ovario durante la palpación transrectal. La aguja de punción atraviesa la pared vaginal (a) cuando se empuja hacia adelante. *In vivo*, la pared rectal se ubica entre la mano del operador y el ovario (b). La línea negra entrecortada delimita la posición del dispositivo de OPU (Bols, 2008). Tomado de Palma, 2008).

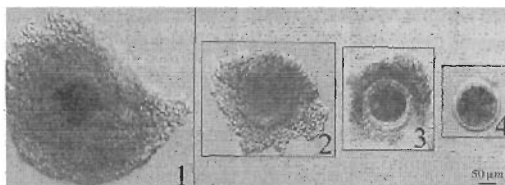


Figura 3. Representación del modo de sujeción del mango y la guía de la aguja durante la sesión de OPU.

COCs en el mismo. Entre una donadora y otra se debe proceder a enjuagar profundamente el sistema de aspiración y cambiar el tubo colector y la aguja.

El material aspirado de cada donadora es pasado a través de un filtro colector con el fin de concentrar los Complejos-Ovocito-Cúmulus (COCs). A través de un estereomicroscopio, los COCs son clasificados de acuerdo con los siguientes parámetros: *Calidad 1*, con más de tres capas de células de cúmulus; *Calidad 2*, con menos de dos capas de células del cúmulus; *Calidad 3*, son aquellos ovocitos con pocas células del cúmulus u ovocitos parcialmente desnudos y *Calidad 4*, ovocitos en estado de atresia o con citoplasma en degeneración como se muestra en la Figura 4.

Células del Cumulus : selección de ovócitos



Maduración nuclear y citoplásmica de ovocitos de diferentes categorías

Categoría de ovócito	Expulsión del CP %	% Blastocisto	Número de células
1	80,4 ^a	32,9 ^a	88,9 ^a
2	69,8 ^a	23,9 ^b	84,7 ^a
3	50,0 ^b	11,1 ^{b,c}	65,5 ^b
4	45,8 ^b	4,7 ^c	60,9 ^b

Figura 4. Clasificación de calidad de los Complejos-Ovocito-Cúmulus (CCOs) y su potencial para la producción de embriones viables. (Tomado y modificado de Stojkovic *et al.*, 2001).

RECUPERACIÓN DE OVOCITOS MEDIANTE ASPIRACIÓN TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASONIDO (OPU) EN GANADO *BOS INDICUS* Y MESTIZO DOBLE PROPÓSITO

Las investigaciones realizadas en ganadería Doble Propósito en cuanto a la técnica de OPU en Venezuela son escasas. Los resultados hasta ahora obtenidos, han estado circunscritos a las diferentes experiencias realizadas por algunas empresas comerciales y algunos equipos de investigación. En este caso, se condujo un experimento preliminar con el fin de evaluar el potencial de la técnica de OPU como herramienta importante en la recuperación de ovocitos en animales mestizos doble propósito *Bos taurus* x *Bos indicus* (Holstein x Brahman, Carora x Brahman, Holstein x Gyr, Pardo Suizo x Brahman), al igual que en animales *Bos indicus* (Brahman, Gyr Lechero) y mestizos *Bos indicus* (Brahman x Gyr).

Los resultados de estos experimentos se muestran en el Cuadro 1. Los datos preliminares de este estudio en cuatro repeticiones, mostraron un efecto significativo ($P < 0,05$) en cuanto a la raza de la donadora sobre el número de complejos ovocito-cúmulus (COCs) totales y COCs viables recolectados mediante la técnica de OPU. Las escasas muestras que hasta este momento han sido evaluadas denotan que la media

más elevada de COCs totales y COCs viables fueron para el cruce Brahman Rojo-Holstein Rojo ($62,16 \pm 6,54$ y $50,31 \pm 7,80$, respectivamente); mientras que la media más baja de COCs totales y COCs viables fueron para el cruce Gyr-Brahman Rojo ($19,25 \pm 3,68$ y $14,37 \pm 5,33$, respectivamente).

Cuadro 1
Número de Complejos ovocito-cumulus recuperados mediante la técnica de OPU en animales *Bos indicus* y mestizos *Bos taurus* × *Bos indicus* en ganaderías de Doble Propósito

Raza	Media Ovocitos/OPU	Media Ovocitos Viables/OPU
F1 Brahman Rojo-Holstein Rojo	62,16 ^a	50,31 ^a
Brahman Blanco	51,49 ^a	27,91 ^b
Brahman Rojo	40,32 ^b	23,91 ^b
F1 Brahman Blanco-Pardo Suizo	38,14 ^{bc}	23,17 ^b
F1 Gyr-Holstein Rojo	27,57 ^{cd}	21,55 ^b
F1 Brahman Blanco-Carora	25,00 ^{de}	19,50 ^b
Gyr Lechero	19,74 ^c	14,77 ^c
F1 Gyr-Brahman	19,25 ^c	14,37 ^c

Letras diferentes en la misma columna denotan una diferencia significativa ($P < 0,05$).

(UNIRA, FCV-LUZ, VIATECA. Datos no publicados).

Los resultados preliminares obtenidos en este estudio, establecen una producción de COCs de gran importancia como futuro potencial para la producción de embriones mediante fecundación *in vitro* en ganaderías de Doble Propósito. Algunos de estos resultados pueden ser comparables con los obtenidos en otros experimentos en animales *Bos indicus*. Sin embargo, es importante aclarar que tales comparaciones carecen de valor científico, debido a que cada experimento posee condiciones de experimentación especiales que limitan la realización de comparaciones, por lo que es importante que en ganadería DP sean realizadas las investigaciones necesarias; y así poder indagar en los factores tanto técnicos como biológicos que suelen afectar la recolección de COCs.

Las razas *Bos indicus* difieren considerablemente de las razas taurinas en la dinámica folicular ovárica en aspectos como el número de ondas foliculares, la tasa de crecimiento folicular, el tamaño máximo del folículo dominante, la maduración ovocitaria y la expresión génica embrionaria. En ese sentido, los datos facilitados por razas *Bos taurus* no deben ser extrapolados a animales *Bos indicus* (Camargo *et al.*, 2007, 2010; Viana *et al.*, 2010). Así mismo, entre razas de la misma especie (Nelore vs. Gyr), se han encontrado diferencias notorias (Pontes *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2010) tal y como lo demuestran los resultados de estas experiencias.

RETOS Y DESAFÍOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE OPU EN LA GANADERÍA MESTIZA DE DOBLE PROPÓSITO

Un paso trascendental para dar inicio a un verdadero programa de mejoramiento genético a través de estas biotecnologías en ganadería de doble propósito, es poder

identificar y seleccionar hembras con mérito genético mediante pruebas estadísticas contundentes. La carencia de registros confiables ha sido la principal barrera con la que los genetistas se han encontrado para lograr sus objetivos de mejora en nuestras ganaderías.

En ese sentido, el desafío más importante para el avance de las distintas biotecnologías, es la ausencia de programas de desarrollo y de investigación en ganado mestizo tropical de doble propósito, por lo que se debe asumir y admitir que todo, o casi todo está por hacer.

Por otra parte, es necesario recordar que la ejecución de programas de mejora mediante el uso de biotecnologías de tercera generación como la OPU, la FIV y del semen sexado, debe tener como base y premisa la organización estructural que facilite la implementación estrictamente necesaria de las Buenas Prácticas Ganaderas en los programas básicos de manejo, en especial, los Programas Genético, Nutricional, Sanitario, Gerencial y del Programa Reproductivo (Gutiérrez-Áñez, 2014).

En algunos casos la importación de genética mejorada garantizada, bien sea mediante la importación de embriones o de hembras de reemplazo, ha permitido incorporar material genético que pudiese ser sometido a los diferentes programas de mejoramiento mediante estas biotecnología para de esa forma, ganar algunos pasos en el desarrollo y mejora productiva de la ganadería de Doble Propósito.

CONCLUSIONES

Los estudios preliminares en ganaderías Doble Propósito demuestran un potencial en el uso de la técnica de OPU para la producción *in vitro* de embriones y el mejoramiento genético de nuestra ganadería.

Sin embargo, es importante asumir que se deben establecer planes estratégicos, que pasen por la organización de las empresas ganaderas y con el establecimiento de convenios multidisciplinarios (gubernamentales, gremiales, universitarios), que permitan integrar esfuerzos, recursos técnicos, económicos y humanos en la implementación de un programa de mejoramiento genético efectivo a través del uso de estas biotecnologías.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bols P. 2008. Punción Folicular (Ovum Pick-Up), en la vaca. En: Biotecnología de la Reproducción. Gustavo Palma (ed). Segunda edición. Reprbiotec. 669p.
- Callesen H, Greve T, Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27 (1): 217 (Abstract).
- Camargo LSA, Freitas C, Sa WF, de Moraes-Ferreira A, Serapiao RV, Viana JHM. 2010. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (Bos indicus) cattle embryos. *Anim Reprod Sci* 120 (1-4): 10-15.
- De Ondiz A, Ruiz-López S. 2011. Aspiración Folicular Transvaginal guiada por Ultrasonografía (OPU), Producción *in vitro* de embriones (PIV) y Semen Sexado en la Reproducción Bovina. En: Innovación y tecnología en la ganadería de doble propósito. C González-Stagnaro, N Madrid-Bury, E Soto-Belloso (eds). Ediciones Astro Data, Maracaibo-Venezuela. LXXIX: 797-805.

- Gutiérrez-Añez JC. 2014. Bases para el establecimiento de buenas prácticas ganaderas en un programa de control reproductivo. En: Buenas prácticas en ganadería Doble Propósito. Cuaderno Científico GIRARZ 14. Yenen Villasmil Ontiveros (ed). Ediciones Astro Data SA. Maracaibo, Venezuela pp. 261-269.
- Gleichert N, Friberg J, Fullan N, Giglia RV, Mayden K, Kesky T. 1983. Egg retrieval for *in vitro* fertilization by sonographically controlled vaginal culdocentesis. *Lancet* 508-509.
- Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen M, Pieterse MC. 1994. Potential use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675-683.
- Palma GA, Olivier N, Neumuller C, Sinowatz F. 2007. Efecto del semen sexado por medio de citometría de flujo sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* y la ultraestructura de blastocistos producidos *in vitro*. Res. VII Simp Intern Reprod Anim, IRAC, Córdoba (Argentina) pp. 205.
- Pieterse M, Kappén K, Kruip Th, Taverne M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30 (4): 751-762.
- Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71 (4): 690-697.
- Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74 (8): 1349-1355.
- Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75 (9):1640-1646.
- Seidel GE. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, 68: 443-446.
- Seidel GE, Schenk JL. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim Reprod Sci*, 105: 129-138.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Anim Reprod Sci* 67 (1-2): 37-43.
- Van Wagtenonk-de Leeuw AM. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65 (5): 914-925.
- Viana JH, Palhao MP, Siqueira LG, Fonseca JF, Camargo LS. 2010. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology* 73 (7): 966-972.