



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Ingeniería Agronómica

**EFFECTO DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA Y EL
INTERVALO ENTRE PROCEDIMIENTOS DE ‘OVIUM PICK UP’
(OPU) SOBRE EL NÚMERO Y CALIDAD OVOCITARIA EN EL
BÚFALO DOMÉSTICO *Bubalus bubalis***

Trabajo final de graduación para optar por el título de:

Ingeniera Agrónoma

Alumno: Leeson, Mia

Profesor: Dra. Marina Sansiñena

Índice de Contenido

1-Resumen	4
2 -Introducción.....	5
3.1-Hipótesis.....	8
3.2 Objetivos	8
3.2.1 Objetivos generales	8
3.2.2 Objetivos específicos	8
4. Revisión Bibliográfica	9
4.1 Características generales de la reproducción de <i>Bubalus bubalis</i>	9
4.2 Estacionalidad y ciclicidad en la búfala	10
4.3 Dinámica folicular	12
4.4 Foliculogénesis	15
4.5 Etapas para lograr la producción de embriones en <i>Bubalus bubalis</i>	16
4.6 Procedimiento de OPU en el búfalo	17
4.6.1 Aspectos a considerar en la aspiración por OPU en búfalos	17
4.7 Fecundación In vitro (FIV)	21
4.7.1 Descripción de la técnica de la FIV	21
4.7.2 Aspectos operativos que influyen al éxito de la FIV en búfalo	22
4.7.2 a) Maduración In Vitro (MIV)	22
4.7.2 b) Capacitación y dosificación del espermatozoide.	24
4.8 Producción in Vitro de embriones (PIV)	26
5. Materiales y metodología	28
5.1 A campo	28
5.2 Evaluación de Calidad Ovocitaria	30
5.2.1 Clasificación Morfológica	30
5.3 Análisis estadístico	31
6. Resultados.....	32
6.1 Experimento 1	32
6.2 Análisis de calidad ovocitaria	33
6.3 Mapeo Ovárico	36
7. Discusión	38
8. Conclusión.....	39
9. Agradecimientos.....	40
10.Bibliografía.....	41

Índice de Figuras

Figura 1: N° de cabezas en las provincias productoras de búfalos en Argentina.....	5
Figura 2: Esquema del control hormonal en <i>Bubalus bubalis</i> , durante el período reproductivo.	10
Figura 3: Esquema de la temporada reproductiva y de anestro de <i>Bubalus bubalis</i>	12
Figura 4: Dinámica folicular durante el ciclo estral de <i>Bubalus bubalis</i>	14
Figura 5: Esquema de la concentración hormonal durante el periodo reproductivo de <i>Bubalus bubalis</i>	15
Figura 6: Esquema de los pasos para una Producción de embriones In-Vitro en <i>Bubalus bubalis</i>	17
Figura 7: Intervención de la técnica de OPU en diferentes fases del desarrollo folicular.....	21
Figura 8: Esquema representativo de la MIV en laboratorio	23
Figura 9: Clasificación de COCs según IETS	24
Figura 10: Evaluación macroscópica de la motilidad del semen.....	25
Figura 11: Capacitación espermática con Swim up.....	26
Figura 12: Fecundación y desarrollo embrionario en bovinos.....	27

Índice de Imágenes

Imagen 1: Instrumental del equipo de OPU.....	18
Imagen 2: a) Búfalas llevadas a la manga para ser sometidas al tratamiento.....	19
b) Uso del ecógrafo en la manga, para evaluar el diámetro folicular (mm) y las ondas foliculares.....	19
Imagen 3: a) Técnico con equipo de OPU; Sujeción del ovario y manejo del mango de OPU.....	19
b) Líquido folicular transportado en termos a temperatura de 39°C. C) El material recolectado llega al laboratorio para ser estudiado	19
Imagen 4: a) Filtrado del líquido folicular obtenido en OPU.....	19
b) Búsqueda y evaluación morfológica por estereomicroscopio de los COCs aspirados.....	19
Imagen 5: Semen congelado en pajuelas, en términos de Nitrógeno líquido a -196°C....	25
Imagen 6: Trabajo en manga con búfalas, procedimiento de OPU con ultrasonido con escáner micro convexo de 5 MHz.....	29
Imagen 7: a) Búfalas donantes en manga.....	29
b) Imagen de laboratorio, clasificación ovocitaria	29
Imagen 8: Clasificación de COCs según IETS	31

Índice de Tablas y Gráficos

Tabla 1: Efecto de la época del año sobre la cantidad de ovocitos recuperados por OPU en <i>Bubalus bubalis</i>	32
Gráfico 1: Media de ovocitos recuperados en <i>Bubalus bubalis</i> , por sesión de OPU en diferentes épocas del año.....	33
Gráfico 2: Efecto del intervalo entre OPU (7 vs. 14 días) sobre el total de ovocitos recolectados en <i>Bubalus bubalis</i>	34
Gráfico 3: Efecto de la estacionalidad en la calidad ovocitaria.....	36
Gráfico 4: Efecto del intervalo de intervención sobre el diámetro folicular de las búfalas.....	37

1. Resumen

El búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) es un animal de extrema rusticidad, adaptado a vivir en zonas marginales. Las técnicas convencionales de reproducción asistida no han sido efectivas en esta especie debido a factores tales como dificultades en la detección de celo, pobre respuesta ovárica a la estimulación hormonal superovulatoria y limitada recuperación de embriones post lavaje uterino. La ‘Ovum Pick Up’ (OPU) es una técnica no quirúrgica transvaginal guiada por ecografía para la recuperación de ovocitos de hembras donantes vivas. Este método es necesario para la aplicación de técnicas de reproducción asistida de mayor complejidad tales como la fecundación in vitro, en la cual se requiere exteriorización de las gametas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la estacionalidad reproductiva y el intervalo entre procedimientos de OPU sobre la eficiencia de recuperación y calidad ovocitaria. Se introdujo la guía transvaginal de 60cm y una aguja de 17G, con una presión de vacío constante. Se utilizaron hembras donantes adultas de fertilidad comprobada (al menos una cría nacida) de razas Murrah y Mediterránea. La OPU se realizó según protocolo establecido a intervalos de 7 o 14 post-ablación total folicular al inicio de los tratamientos (día 0). La cantidad y calidad de los ovocitos recuperados fue evaluada utilizando un estereomicroscopio 50X, clasificándose los ovocitos en escala de 1 a 4 (grado 1: excelente). Las variables fueron analizadas estadísticamente con el programa INFOSTAT, utilizándose la prueba de ANOVA seguida de test de Tukey ($p < 0.05$). No se detectó efecto significativo del intervalo entre punciones (cada 7 vs 14 días) sobre la cantidad total de ovocitos recuperados cuando las OPU fueron realizadas en invierno. Por el contrario, se encontró efecto del intervalo cuando las OPUs fueron realizadas en primavera y verano, obteniéndose significativamente menor cantidad de ovocitos por punción con intervalos entre sesiones de 7 días. No se hallaron efectos de la época del año sobre la cantidad de ovocitos de buena calidad (grados 1 y 2) recuperados. En conclusión, la técnica de OPU permitiría maximizar el rendimiento de la genética mediante la obtención de ovocitos para producción in vitro de embriones, aún en épocas fuera de estación reproductiva.

Palabras clave: Búfalo- OPU - FIV - Foliculogénesis - Estacionalidad- Reproducción Asistida

2. Introducción

El búfalo es un animal de gran potencial productivo, es utilizado en sistemas de producción de triple propósito; leche, carne y carga. La población bubalina mundial es de aproximadamente 200 millones de cabezas, siendo Asia responsable del 96% de la producción. Argentina, hoy en día, ocupa un rol insignificante en la cría de ganado bubalino a nivel mundial, con 100.000 cabezas de las cuales 32.000 son hembras, posicionándose cuarta en latinoamérica detrás de Brasil, Venezuela y Colombia (Agritotal- El Rincón del Norte, Producción animal, 2017).

En la última década, la ganadería Argentina ha sufrido un desplazamiento hacia las zonas productivas marginales. La agricultura ha avanzado y ha ganado el territorio de las tierras con mejor aptitud agrícola, con un aumento del rendimiento del 18% y un aumento de la superficie sembrada de hasta un 50% (R. G. Ybran, 2016). Esta reorganización del mapa productivo ganadero hace a la cría de ganado bubalino sumamente atractiva, no solo por su rusticidad y capacidad de adaptación a condiciones de inundación y sequía, sino también por su excelente adaptación a zonas marginales con mala calidad de pastizales y pasturas. En este sentido, Argentina cuenta con un potencial no explotado de la actividad, con una posibilidad de cría bubalina en 8 millones de Ha ubicadas en los esteros correntinos, la cuenca del río Salado en Buenos Aires, el predelta entrerriano y delta bonaerense, y las costas del río Paraná y Paraguay (J.L Konrad et al., 2016).

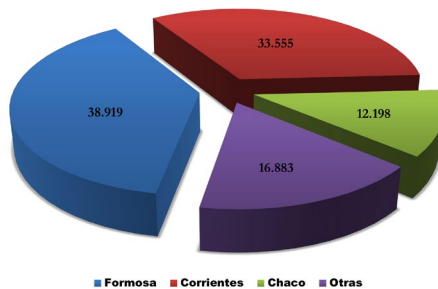


Figura 1: N° de cabezas en las provincias productoras de búfalos en Argentina. (Fuente: Konrad 2016).

El mejoramiento genético es uno de los pilares fundamentales para la actividad pecuaria, ya que permite seleccionar la genética deseada acorde a el tipo de producción, problemas del establecimiento, enfermedades y clima regional. Entre las herramientas comúnmente utilizadas para la propagación, conservación y mejoramiento de la genética, la

biotecnología reproductiva tiene un papel preponderante en técnicas tales como la transferencia embrionaria (TE), inseminación artificial (IA) y fecundación in vitro. La TE tiene como objetivo principal aumentar la cantidad de embriones transferibles por hembra, y para ello han de combinarla con un tratamiento de superovulación (Restrepo, 2008). En el búfalo, la TE como herramienta de mejoramiento genético no ha tenido el mismo éxito que en el ganado vacuno debido a que la búfala exhibe una moderada a pobre respuesta ovárica a los tratamientos hormonales de superovulación. A esta limitante se agregan una recuperación de embriones post lavaje reducida, y una detección de celos dificultosa por la presencia de estros silenciosos sin signos visibles (Konrad et al., 2013).

Una herramienta alternativa para superar estas limitantes es la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Ovum Pick Up, OPU), originalmente desarrollada para la recuperación ovocitaria en reproducción asistida de la especie humana (Lenz et Laurinsten 1982), siendo utilizada por primera vez en ganado vacuno en Holanda, al final de la década del 80 (Pieterse et al., 1988) y puesta en práctica de forma rutinaria para la reproducción asistida veterinaria a partir de 1994 (Kruip et al., 1994).

La OPU es una técnica que permite recuperar en forma repetible y no quirúrgica los ovocitos de hembras destinados al procedimiento de FIV. Esta técnica permite reutilizar a las hembras donantes en intervalos más cortos de tiempo y, como el material recolectado tiene procedencia conocida, se puede utilizar también para mejorar la genética del rebaño. La técnica facilita al operador intervenir en varios estados fisiológicos del ciclo estral; cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación, como también en aquellas que no responden a estímulos hormonales, o en animales viejos con desórdenes reproductivos de origen no genético (Galli et al., 2001). La alta repetibilidad de la técnica fue estudiada en bovinos, donde se ha demostrado que un mismo animal puede ser intervenido hasta 2 veces por semana durante 5 a 6 meses, sin afectar negativamente sobre el bienestar del animal ni alterar el ciclo reproductivo. (J. Samaniego et al., 2017). La frecuencia de aspiración permite aumentar el potencial de las hembras bovinas e intervenir hasta 8 veces por mes, con una extracción de ovocitos elevada y futura producción de embriones in vitro viables. Por este motivo, la intervención en períodos más cortos ha permitido aumentar la recolección de ovocitos, logrando que la combinación de las técnicas OPU, FIV y PIV permitan aumentar la cantidad de embriones totales por hembra en tiempos reducidos. A la hora de comparar estas técnicas con las de

superovulación y TE, éstas últimas demostraron tener resultados más bajos; evaluando el total de embriones logrados por hembra, principalmente porque la recuperación ovárica para un nuevo lavaje necesita de aproximadamente 60 días (Terzano, 2005), mientras que para la OPU, con intervenciones semanales de la técnica, en 60 días se podrían lograr, por lo menos, 12 intervenciones.

En la especie bubalina, la información sobre las técnicas de OPU y FIV es escasa. El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar una frecuencia entre sesiones de OPU que maximice la eficiencia reproductiva, la recuperación y calidad ovocitaria de las donantes bubalinas. Asimismo, teniendo en cuenta que la búfala tiene un ciclo reproductivo estacional tendiente al fotoperiodo negativo, se evaluó la técnica de OPU como una alternativa de extracción de ovocitos durante el período de anestro.

3.1 Hipótesis

- El número y la calidad de los ovocitos en complejos cumulus-ovocitarios (COCs) recolectados a través OPUs repetidas, podría ser afectado por el intervalo entre sesiones de aspiración folicular (7 vs 14) y la época del año en la especie *Bubalus bubalis*.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

- Analizar la factibilidad de utilizar la técnica de OPU en rodeos bubalinos.
- Estudiar el efecto de la frecuencia de OPU sobre la dinámica folicular, cantidad y calidad de ovocitos recuperados.

3.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la calidad y cantidad de ovocitos recuperados utilizando la técnica de OPU a intervalos de 7 o 14 días en hembras de la raza *Bubalus bubalis*, con el fin de aumentar la producción de embriones in vitro.
- Realizar un mapeo ovárico con el tamaño de ovocitos presentes en intervalos de 7 y 14 días de intervención de sesiones de OPU.
- Evaluar la factibilidad y eficiencia de OPU en diferentes épocas del año.

4. Revisión de Bibliografía

4.1 Características generales de la reproducción del búfalo

Tradicionalmente, el búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) ha sido comparado erróneamente con el ganado vacuno (*Bos taurus*, *Bos indicus* y sus híbridos) aunque existen importantes diferencias en cuanto al manejo, pubertad, ciclicidad y vida reproductiva media entre ambas especies. Una de las ventajas de la búfala como reproductora, es que potencialmente puede funcionar como vientre hasta 18 años mientras las condiciones de sanidad, manejo y alimentación sean las adecuadas. Actualmente una de las principales causas de descarte de vientres bovinos es el desgaste dentario, normalmente llamadas vacas CUT, con último ternero al pie de la madre. Estas hembras normalmente tienen una vida útil reproductiva de entre 6 y 8 años, limitada por el desgaste dentario. El desgaste dentario no es un factor que afecte a la cría bubalina, de hecho, es una condición que le da rusticidad a la especie, permitiendo la cría en pastizales y pasturas de mala calidad, que de lo contrario en bovinos aceleraría el desgaste. Las diferencias entre ambas especies se extienden al sistema reproductivo y hormonal, siendo la búfala poliéstrica estacional de fotoperiodo negativo, en otras palabras, requerirá de días cortos y frescos para presentar celo. Ésta condición limita la fertilidad de las hembras a las épocas de otoño e invierno, y hace que los rodeos se dividan en animales cíclicos y no cíclicos. La duración del ciclo estral es de aproximadamente 21 días (rango 18-24 días), el período de gestación es de 11 meses, la primera ovulación ocurre entre los 15 y 18 meses y la madurez sexual suele ser alrededor de los 2 años (Konrad et al., 2014)

En animales poliéstricos continuos o anuales como el ganado vacuno, los animales presentan ciclos estrales y ovulaciones durante todo el año, siendo esta dinámica interrumpida por la existencia de preñez y puerperio. Tomando como referencia la Figura 2, en animales poliéstricos no interviene la glándula pineal, ni los estímulos lumínicos externos para que ocurra la ovulación, de lo contrario, la estimulación hormonal arranca en el hipotálamo, donde se sintetizan y secreta la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que actuarán a nivel de la Hipófisis. La liberación de las GnRH es importante para la secreción de las dos gonadotrofinas: la FSH (Follicle Stimulating Hormone') y LH ('Luteinizing Hormone'). La FSH, hormona folículo estimulante, es la responsable del crecimiento y maduración de los folículos ováricos. La LH, por otro lado, es la hormona luteinizante, y en conjunto con la FSH actúan sobre la maduración de los

foliculos. En última instancia, la LH es la responsable de la ovulación y de la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. La progesterona es una hormona esteroide producida por el cuerpo lúteo, que inhibe la secreción de LH generando un feedback negativo (-) sobre la hipófisis y el hipotálamo. En el caso de la FSH, el feedback negativo se generará con la liberación de inhibina, producida por el folículo preovulatorio o dominante.

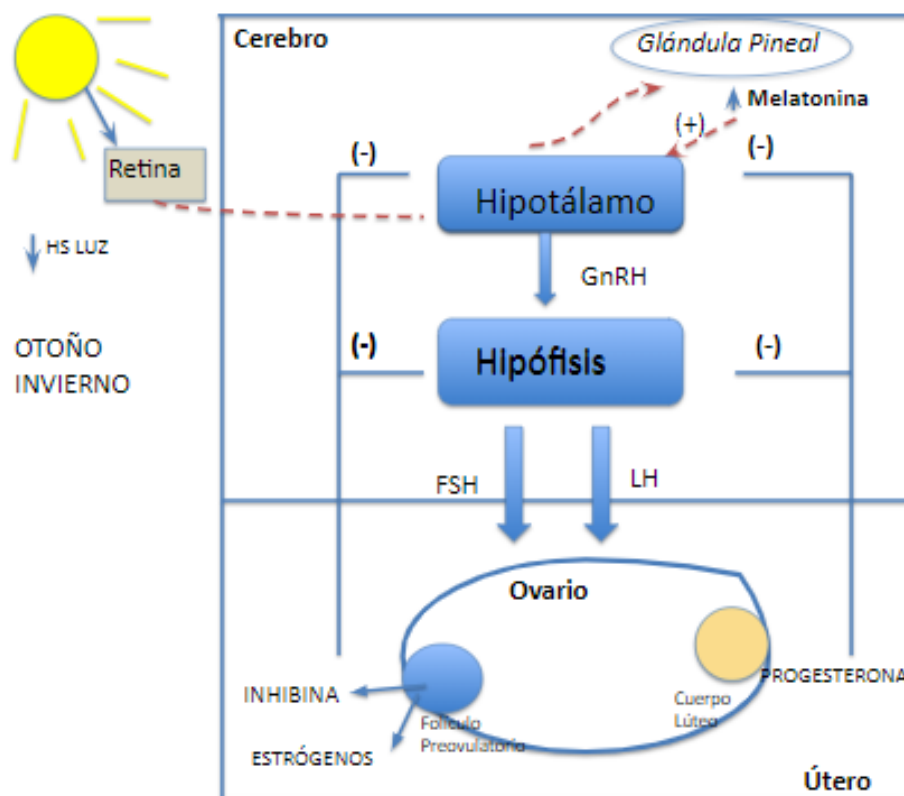


Figura 2: Esquema del control hormonal en Bubalus bubalis, durante el período reproductivo. (Fuente: Realización personal, Mia Leeson 2018)

4.2 Estacionalidad reproductiva de la Búfala

En *Bubalus bubalis*, a diferencia del ganado vacuno, y como podemos ver en la Figura 2, el ciclo reproductivo está controlado por la duración de las horas de luz, siendo uno de los factores determinantes que intervienen en la ovulación y en la secreción hormonal. El estímulo comienza en la retina, y a diferencia de los animales poliéstricos no estacionales, aquí interviene la glándula pineal, encargada de la secreción de la hormona melatonina. La melatonina es la principal responsable de establecer el carácter reproductivo estacional, marcando el inicio de la actividad reproductiva e ingreso al patrón de

ciclicidad y ovulación con la disminución de cantidad de horas de luz, en otoño e invierno. Los mensajes son originados en la retina, pasando por el hipotálamo hasta llegar a la glándula pineal, como podemos ver en la Figura 2. La melatonina juega un papel crucial para el inicio de la actividad reproductiva de los bubalinos, de tal forma que la liberación de melatonina aumenta con la oscuridad, es decir con la reducción de las horas de luz. Esto genera un feedback positivo en el hipotálamo que permite la secreción de GnRH, FSH y LH en las concentraciones correctas hasta alcanzar el pico ovulatorio. Contrariamente, durante el verano y la primavera cuando los días se alargan, la producción de melatonina se ve disminuida.

La Figura 3 ejemplifica lo que ocurre en las diferentes estaciones del año. Con el alargamiento de los días, la GnRH será liberada de forma pulsátil con una baja amplitud y frecuencia, resultando insuficiente para lograr el pico de LH. Lo importante a destacar durante el período de anestro es que no habrá pico de LH que induzca a la ovulación, aunque la FSH y LH se continúe secretando de forma pulsátil. Este evento es extremadamente importante para las técnicas de reproducción asistida, particularmente la OPU ya que la concentración de FSH será óptima para el reclutamiento folicular resultando en existencia de folículos aspirables aún fuera del período reproductivo de la búfala. En el anestro, el reclutamiento folicular será de folículos con diámetros pequeños, de entre 2 a 9 mm, que no llegarán a un diámetro máximo o folículo preovulatorio, sino que de lo contrario, entrarán en regresión y estimularán el comienzo de nuevas ondas foliculares.

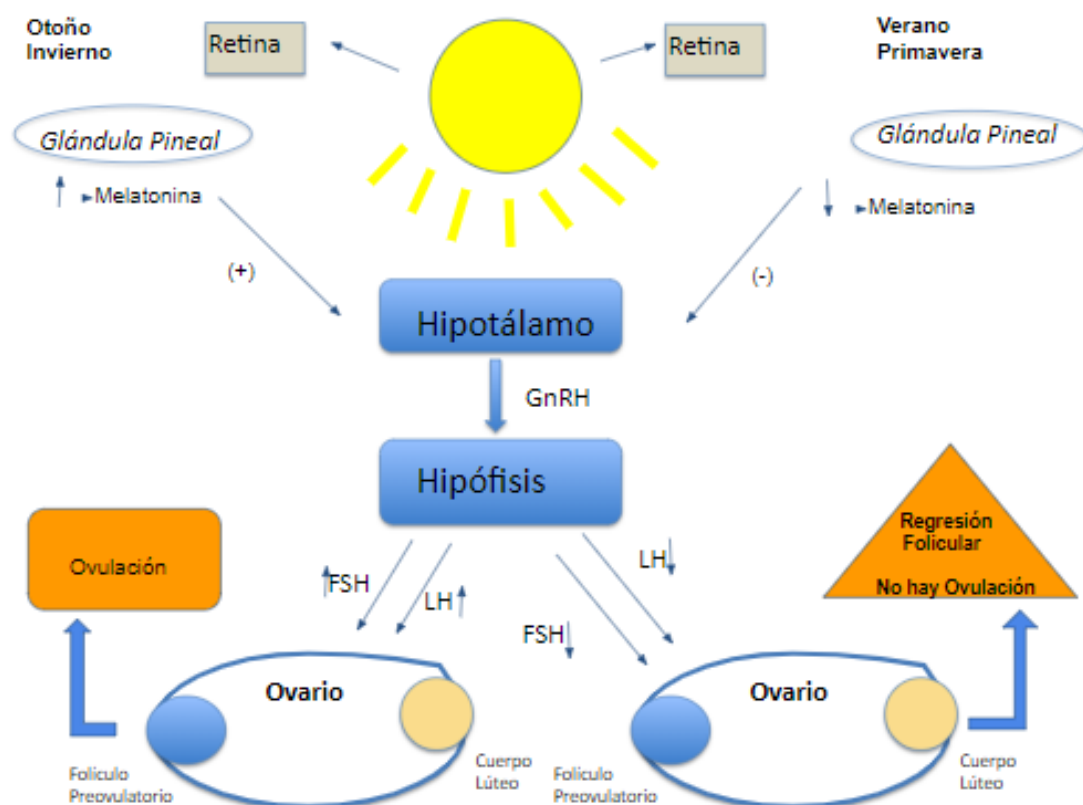


Figura 3: Esquema de la temporada reproductiva y de anestro de Bubalus bubalis. (Fuente: Realización personal, Mia Leeson 2018)

4.3 Dinámica folicular

La dinámica folicular es el proceso de crecimiento y regresión de los folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio (Salinas et., al 2011). En la búfala, el monitoreo ecográfico ha establecido que predominan los patrones de dos ondas de crecimiento folicular (63.3%), en comparación con tres (33.3%) y una sola (3.3%) (Awasthi y col. 2006; Campanile y col. 2010; Perera B.M.A.O. 2011). El número de ondas influye en la duración del ciclo estral, y puede ser también la causa de que el número promedio del ciclo estral sea de 21 días en un rango de 18 a 24 días aproximadamente.

La onda de desarrollo folicular para la especie bubalina está compuesta por 3 etapas: reclutamiento, selección y dominancia (Terzano, 2005).

1- Reclutamiento: inicia con el comienzo de una nueva onda folicular, es la etapa con mayor cantidad de folículos primordiales, de entre 3 a 30 (diámetro 2-4 mm). Aquí

comenzarán la etapa de crecimiento y desarrollo.

2- Selección: se da en aproximadamente el 4to día del ciclo, donde se pasa de un folículo primario a uno secundario. En este punto, el folículo seleccionado para dominancia secretará inhibina, que inhibirá específicamente la secreción de FSH, deteniendo el crecimiento del resto de los folículos, provocando la atresia.

3-Dominancia: El folículo dominante alcanza un diámetro de hasta 10 mm y genera un efecto de inhibición sobre el resto. Con la ovulación o atresia de este folículo se genera una nueva liberación de FSH que a su vez da lugar a una nueva onda folicular.

La atresia se presenta en aquellos folículos anovulatorios, en cualquiera de las etapas mencionadas anteriormente.

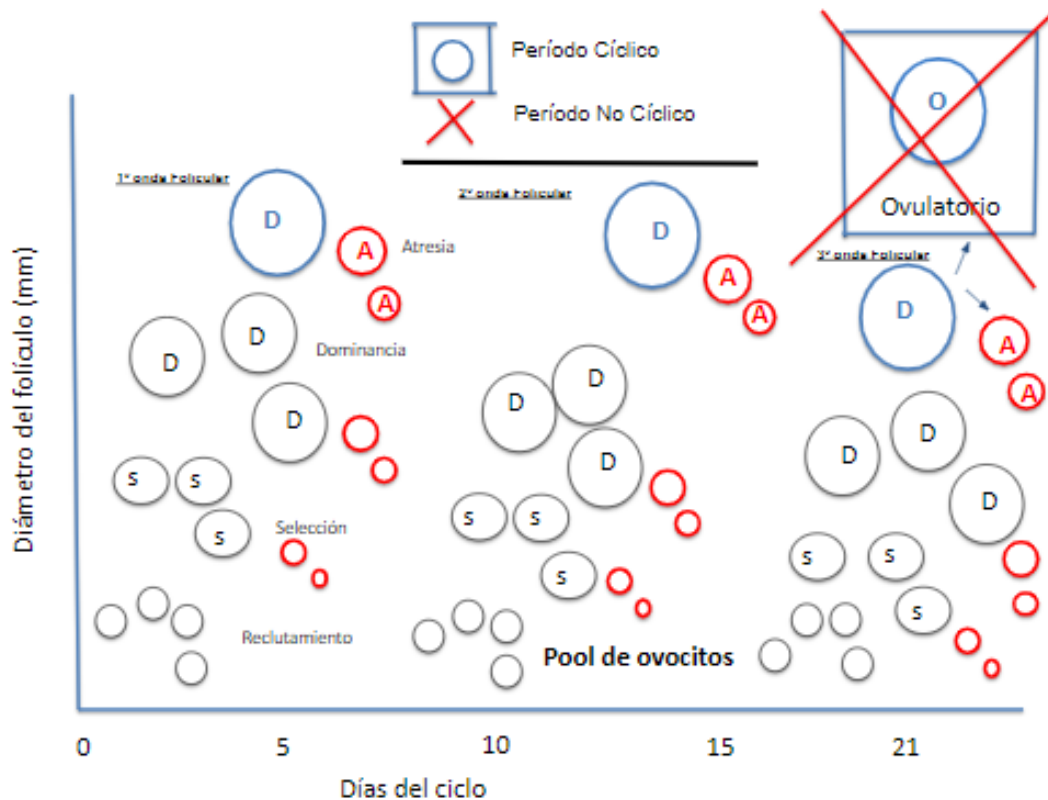


Figura 4: Dinámica folicular durante el ciclo estral de Bubalus bubalis. Fuente: realización personal, Mia Leeson 2018.

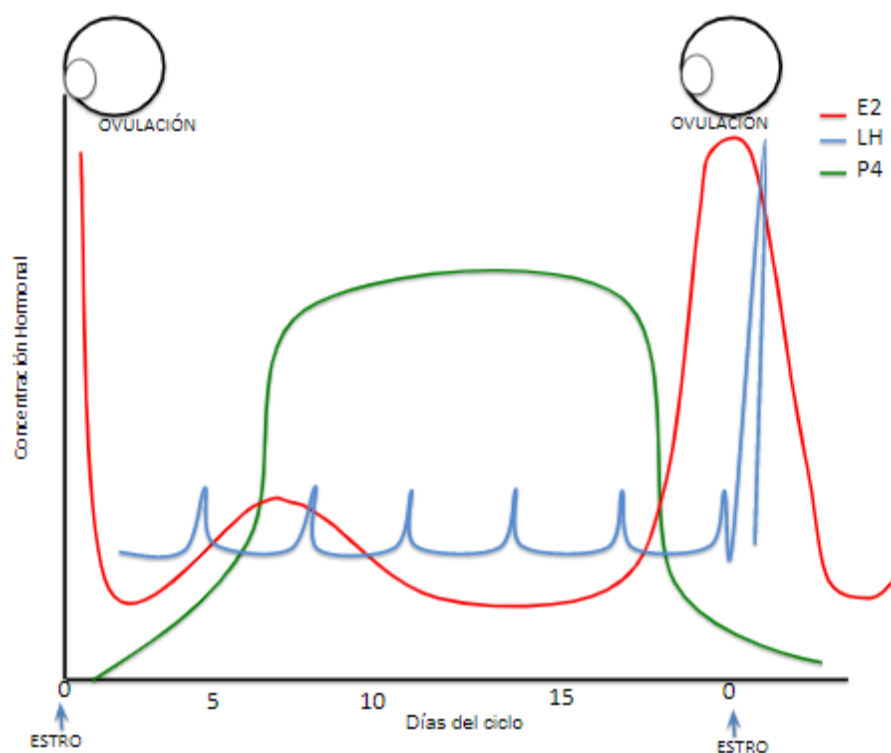


Figura 5: Esquema de la concentración hormonal durante el periodo reproductivo de Bubalus bubalis. Fuente: Realización personal Mia Leeson 2018

En cada una de las ondas foliculares, como podemos observar en la Figura 4, habrá un pool de folículos que pasarán por diferentes tamaños y estadios para lograr que finalmente solo uno se convierta en el folículo dominante mientras que el resto quedará suprimido y entrará en regresión. La regresión es la que permitirá dar comienzo a una nueva onda folicular. Cuando los niveles de progesterona sean altos, como podemos observar en la Figura 5, no habrá ovulación, por lo tanto, no habrá un folículo dominante ovulatorio, y consecuentemente ocurrirá la regresión folicular.

Las Figuras 4 y 5 ejemplifican el efecto de la concentración hormonal sobre la dinámica folicular. Se utilizó un ejemplo de 3 ondas foliculares donde las altas concentraciones de progesterona entre los días 5 y 16 no permitirán que la ovulación ocurra, como podemos observar en la figura 4, todos aquellos folículos dominantes entrarán en regresión y consecuentemente estimularán una nueva onda folicular. Aproximadamente en el día 16, cuando los niveles de progesterona empiezan a disminuir, el folículo dominante se convertirá en ovulatorio y ocurrirá el estro, como consecuencia de la presencia de un pico de E2. En la ovulación se liberará el ovocito de mayor tamaño al oviducto, y estará listo

para ser fecundado. En el período no cíclico, el anestro de primavera- verano, no habrá pico de E2 por lo tanto no habrá ovulación, y consecuentemente esos folículos entrarán en regresión una y otra vez.

.4.4 Foliculogénesis

La foliculogénesis describe el proceso de maduración y desarrollo de los folículos ováricos. Los folículos ováricos se desarrollarán a partir de los folículos primordiales y sufrirán diferentes etapas morfológicas. La búfala presenta un promedio de 12.636 folículos primordiales, mientras que el ganado vacuno cuenta con 150.000 (Terzano, 2005) al momento del nacimiento. Los folículos primordiales representan el pool de folículos de reserva de la población folicular presente en el ovario, son aquellos que tienen el ovocito rodeado por una sola capa de células de pre-granulosa. Al tener un promedio de 12.636 folículos primordiales, podemos inferir que la búfala posee 10 veces menos reservas que aquellas presentes en una vaca.

La superovulación es un tratamiento de inducción a ovulaciones múltiples a través del uso de gonadotrofinas exógenas. La implementación de hormonas exógenas en técnicas de reproducción asistida tiene como fin principal aumentar el número de folículos pre-ovulatorios para la producción de embriones viables. El procedimiento de superovulación utilizado en búfalas suele ser el mismo que en el ganado vacuno; sin embargo, uno de los grandes inconvenientes a la hora de someter a la búfala a tratamientos de superovulación es que la respuesta a la estimulación hormonal es menor en el bubalino respecto al ganado vacuno. En búfalas, existe muy poca variación en la respuesta observada entre una búfala tratada de una no tratada. Si se la compara con una vaca, el reclutamiento de ovocitos totales en una vaca tratada es sumamente mayor que el de una vaca no tratada. Los motivos de la insuficiente respuesta en la búfala está relacionado, según los investigadores (Zicarelli et al 2000), con el número total de folículos primordiales o reservorio de folículos que tiene la búfala a lo largo de su vida reproductiva. Adicionalmente, se ha observado que la Búfala tiene un 67% de atresia folicular, versus 50% en el ganado vacuno. Al parecer, los ovocitos de búfala están sometidos a una más rápida degeneración por atresia, lo que reduce su fertilidad y la obtención de cantidad y calidad de folículos, al compararlo con los de la vaca (Terzano 2005). Estas diferencias han enfocado la atención de los esfuerzos de investigación, a fin de comprender en profundidad el funcionamiento del ovario bubalino: la dinámica folicular, foliculogénesis ovárica,

patrones endocrinos y la población folicular (Terzano 2005).

4.5 Etapas para lograr la producción de embriones en *Bubalus bubalis*

La producción de embriones utilizando la OPU, fecundación in vitro (FIV) y producción in vitro de embriones (PIV) combinadas requieren de pasos fundamentales para el éxito. La Figura 6 representa, en forma resumida, los pasos a seguir para lograr una producción de embriones in vitro y trasplante embrionario exitoso en búfalas sincronizadas. Como se observa, la aspiración folicular es el primer paso dentro del esquema y es fundamental para la producción de embriones in vitro. Es fundamental, principalmente, porque de la cantidad y calidad de ovocitos recolectados surgirá la materia prima para los siguientes pasos. En este sentido, determinar un intervalo adecuado entre cada OPU es de suma importancia ya que implica: a) lograr la mayor cantidad de ovocitos recolectados por sesión, b) maximizar el potencial reproductivo de cada hembra y c) producir la mayor cantidad de embriones viables en una menor cantidad de tiempo.

A continuación se detallarán los puntos claves a tener en cuenta de cada una de las etapas:

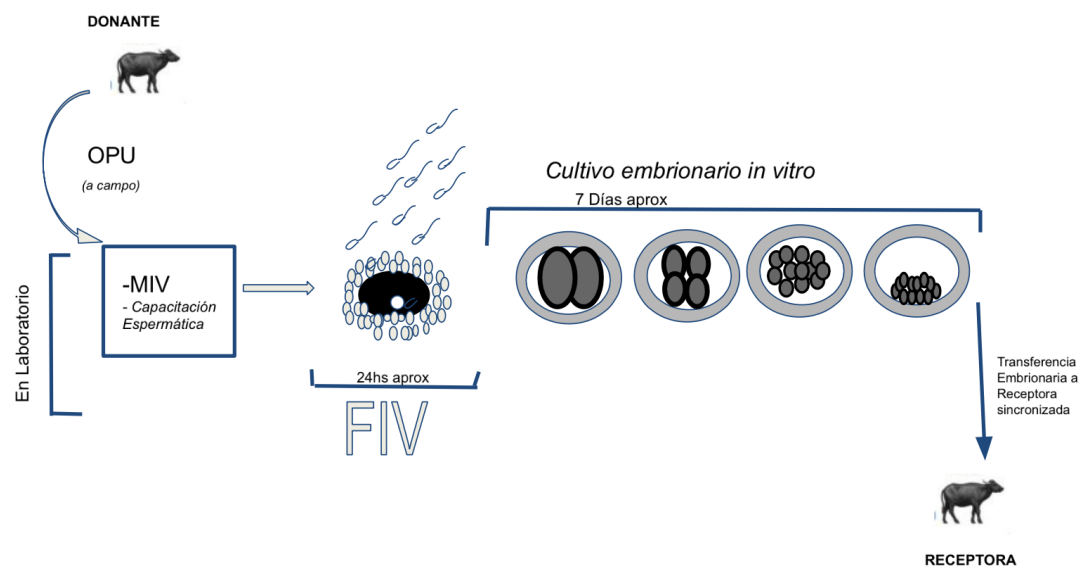


Figura 6: Esquema de los pasos para una Producción de embriones In-Vitro en Bubalus bubalis. Fuente: realización personal, Mia Leeson 2018.

4.6 Procedimiento de OPU en el búfalo

La OPU es una técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (o

ecografía). La implementación de la técnica permite obtener ovocitos de una donante de alto valor genético, in vivo y de forma no quirúrgica. Esos ovocitos serán recolectados y posteriormente utilizados para la producción de embriones in vitro (PIV). Para el desarrollo de la OPU es importante contar con instalaciones adecuadas, personal capacitado, y logística de trabajo a campo para arrear a las búfalas a la manga. Las intervenciones se podrán realizar de forma rutinaria, es por ello que será importante establecer un plan organizado, fijando los intervalos previamente.

Para dar comienzo a la práctica se necesita, en primer lugar, de una guía o manguito para OPU. La guía será introducida en la vagina de la búfala en conjunto con la aguja, la aguja será utilizada específicamente para llevar a cabo la punción folicular. Asimismo, la mano izquierda se introducirá en el recto de la hembra, para palpar los ovarios. La guía de OPU estará conectada a una bomba de vacío, a una presión de 50 Hgm aproximadamente, esta presión ejercida en la vagina permitirá aspirar el líquido folicular y será colocado en tubos de 50ml. El ecógrafo, por otro lado, será una herramienta adicional que permitirá monitorear las ondas foliculares, tomar nota sobre el diámetro folicular de los folículos que serán aspirados, y hacer un chequeo del estado reproductivo y hormonal de la hembra. (INIA - Madrid, 2016, ‘Reproducción asistida en bovinos usando Ovum Pick Up y FIV’)



A) Guía para OPU

B) Bomba de Aspiración



C) Ecógrafo



D) equipo conectado en la manga

Imagen 1: Instrumental del equipo de OPU. Fuente: Realización personal Mia Leeson 2018. Imagen D tomada en la cabaña Las Tilitas, corrientes, Argentina.

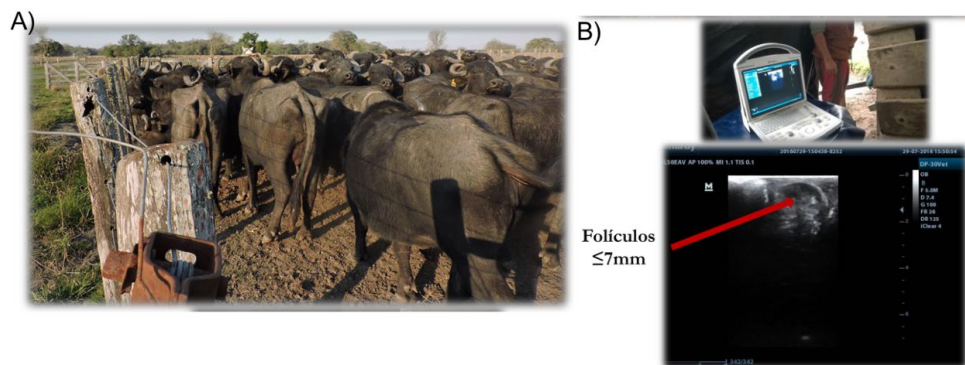


Imagen 2: a) Búfalas llevadas a la manga para ser sometidas al tratamiento. b) Uso del ecógrafo en la manga, para evaluar el diámetro folicular (mm) y las ondas foliculares.



Imagen 3: A) Técnico con equipo de OPU; Sujeción del ovario (mano izquierda) y manejo del mango de OPU (mano derecha). (Ruiz, 2010). B) Líquido folicular transportado en termos a temperatura de 39°C. C) El material recolectado llega al laboratorio para ser estudiado. Imagen tomada del laboratorio de biotecnología de la UCA Ciencias Agrarias, Colegiales, Argentina.

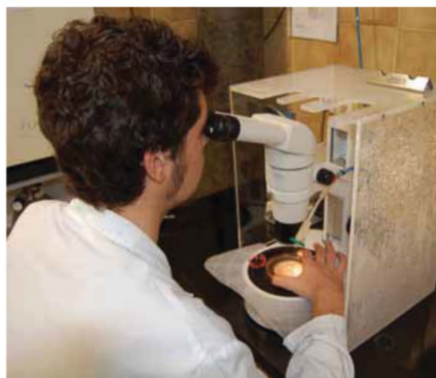


Imagen 4: a) Filtrado del líquido folicular obtenido en OPU b) Búsqueda y evaluación morfológica por estereomicroscopio de los COCs aspirados. (Fuente: Ruiz, 2010)

La tasa de recuperación de ovocitos estará influenciada por la presión de vacío, la frecuencia de punción, el estado del ciclo, la aguja, la experiencia del operador que lo llevará a cabo y por último si existe o no un pre tratamiento hormonal en el animal. El éxito del procedimiento será el punto clave para lograr la mayor cantidad de ovocitos recolectados por hembra, ya que en definitiva los ovocitos serán la materia prima que permitirá aumentar la producción posterior de embriones/hembra en el laboratorio. Una vez recolectados los ovocitos, se deberán trasladar en termos a temperatura controlada. Estos termos se llevarán al laboratorio, donde el líquido folicular será filtrado, y los ovocitos serán identificados y clasificados bajo una lupa estereomicroscópica 50x, en un rango de grados 1 a 4 (grado 1= máxima calidad).

4.6.1 Aspectos a considerar en la aplicación de OPU en búfalos

En búfalos, la baja respuesta a los tratamientos de superovulación y programas de transferencia de embriones ha despertado el interés de lograr propagar genética superior utilizando técnicas de reproducción asistida como la producción in vitro de embriones (PIV) (Terzano, 2005). El éxito de la PIV viene acompañado de la tecnología de fecundación in vitro (FIV) y la aspiración folicular (OPU). La técnica de OPU demostró ser no invasiva para los animales, y un procedimiento que se puede llevar a cabo en un animal repetidas veces, con el fin de recolectar los ovocitos inmaduros de una hembra genéticamente conocida e in vivo. En búfalos no se han desarrollado conclusiones tan determinantes, por la falta de investigación en la especie. Es por ello que uno de los objetivos de este trabajo es poder determinar la frecuencia de intervención de la OPU para lograr la mayor extracción de ovocitos/ hembra posibles.

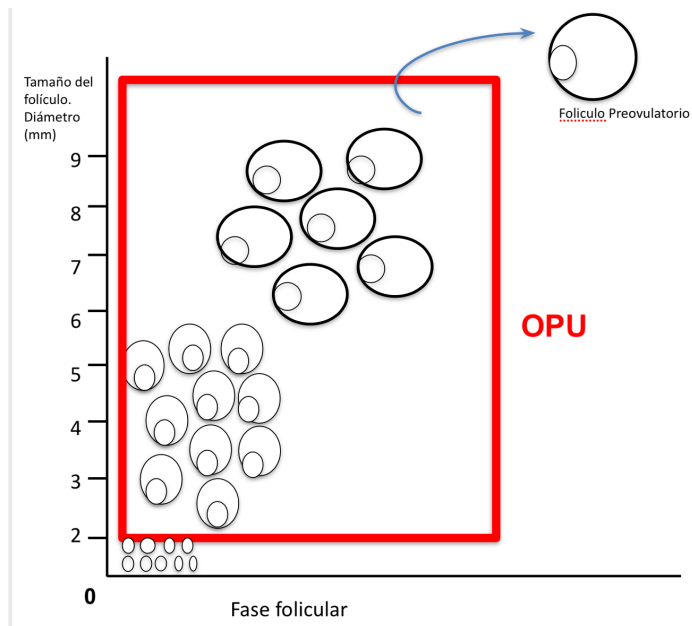


Figura 7: Intervención de la técnica de OPU en diferentes fases del desarrollo folicular (Fuente: Mia Leeson, realización personal).

La Figura 7 indica cómo funciona la intervención de la OPU en la dinámica folicular de la hembra, permitiendo la recolección de materia prima para una futura FIV mediante la aspiración de folículos pequeños a medianos, entre 2 a 9mm de diámetro. En otras palabras, no se necesita un folículo dominante o preovulatorio, de lo contrario, son los folículos de menor tamaño los que nos permiten aumentar la cantidad de gametas femeninas recolectadas y consecuentemente la posibilidad de embriones producidos por hembra.

4.7 Fecundación In Vitro (FIV)

La implementación de la FIV en los rodeos permite el mejoramiento de la genética de un rodeo de forma más rápida, acortando los intervalos generacionales y mejorando los índices y efectividad de preñez de la especie en cuestión. Con el correr de los años, la técnica fue evolucionado, y se ha utilizado la FIV como herramienta para lograr una mayor cantidad de embriones por donante utilizando de forma efectiva el semen de machos de alto valor genético. Es por esta razón que la técnica tuvo mucha importancia a nivel mundial, ya que con el tiempo se empezó a ver a la FIV como la solución a muchos problemas de la reproducción natural, entre ellos: la utilización de hembras receptoras

con bajo valor genético, evitar la propagación de enfermedades venéreas dentro de un rodeo, solucionar los problemas de fertilidad e intervenir en la mejora genética.

4.7.1 Descripción de la técnica de la FIV

La FIV es la técnica de reproducción asistida que busca replicar las condiciones de fecundación natural en un laboratorio. Es por ello que el proceso consta de 3 etapas fundamentales; en primer lugar, la maduración in-vitro de los ovocitos (MIV) y capacitación espermática, etapas fundamentales como paso previo a la fecundación. En segundo lugar, la co-incubación del ovocito madurado y el espermatozoide capacitado para llevar a cabo la fecundación in-vitro (FIV) y por último el cultivo in-vitro (CIV) que permitirá el desarrollo del cigoto durante 7 días en el laboratorio. A continuación se enuncian y describen brevemente aspectos a tener en cuenta para el éxito de la técnica, tanto en los pasos previos como posteriores a la FIV.

4.7.2 Aspectos operativos que influyen al éxito de la FIV en búfalo

4.7.2a) Maduración in vitro (MIV)

La selección de ovocitos para su futura maduración es fundamental para lograr un alto porcentaje de clivaje embrionario. Se llama clivaje al proceso embriológico temprano que consiste en una serie de divisiones celulares mitóticas del óvulo ya fecundado (Palma A, 2008).

Una vez recolectado el líquido folicular mediante aspiración con la técnica de OPU, este será trasladado al laboratorio en termos a temperatura controlada (37°C). El líquido folicular deberá ser filtrado repetidas veces, eliminando la sangre y cuerpos extraños, para luego poder aislar, identificar y clasificar los ovocitos presentes en la muestra con una lupa estereomicroscópica 50x. Como los ovocitos recolectados tendrán diferente tamaño y calidad, será necesario hacer, 24hs previo a que ocurra la FIV, una selección y posterior maduración in vitro (MIV).

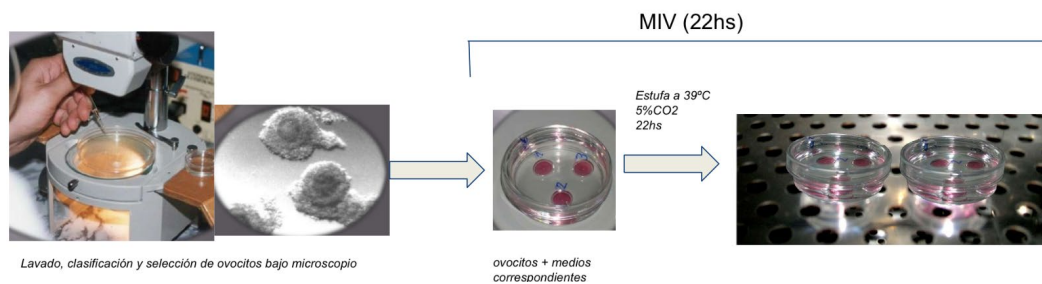


Figura 8: Esquema representativo de la MIV en laboratorio. Realización personal Mia Leeson.

La clasificación de ovocitos es realizada bajo lupa estereomicroscópica 50x, teniendo en cuenta, principalmente, características de calidad relacionadas al citoplasma y a las capas de células del cumulus. La presencia de cumulus alrededor del ovocito es fundamental para la maduración in vitro final del mismo previo a la FIV y para el éxito de la penetración espermática y fecundación propiamente dicha (Palma A, 2008). El cumulus, mediante quimiotaxis, permite aumentar el número de espermatozoides alrededor del ovocito, brindándole a los espermatozoides un microambiente para llevar a cabo la reacción de acrosoma, penetración de zona pelúcida y fusión al oolema.

Los COCs de buena calidad están rodeados por un cumulus compacto que puede tener varias capas. La clasificación ovocitaria se realiza en una escala del 1 al 4; donde los de mayor calidad son los 1 y 2 (clasificación de International Embryo Technology Society, IETS):

1. Rodeados de numerosas capas de células del cúmulo compactas
2. Rodeado de 2 a 3 capas de células del cúmulo compactas
3. Ovocitos sin cúmulos, sólo rodeados por la corona radiata.
4. Ovocitos desnudos
5. Sin cumulus.

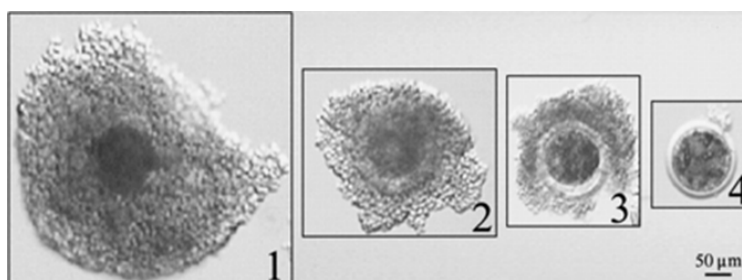


Figura 9: Clasificación de COCs según IETS (Stringfellow D, Givens, D, 2011).

La calidad del ovocito sometido a la FIV será un factor determinante a evaluar para lograr un clivaje exitoso. Según han manifestado algunos investigadores, los ovocitos de tipo G1 y G2 que llegan a ser fertilizados mediante la FIV, solo llegan a la división celular el 80% de los G1 y el 77% de los G2, y de aquellos que logran la división celular, llegan al estadio de blastocisto solo el 40% de los G1 y el 20% de los G2. Por el otro lado, con los ovocitos de menor calidad, los G3 y G4, cuando se los somete a una FIV, solo consiguen dividirse el 40% de los G3 y un 34% en el caso de los G4, pero los investigadores aseguran que los ovocitos de mala calidad no llegan a alcanzar su desarrollo a blastocisto (Gonzalez J, 2013.). El estadio de blastocisto será el estadio embrional que se buscará lograr en condiciones de laboratorio, con el fin de transferirlo no quirúrgicamente al útero de una hembra sincronizada.

4.7.2b) Capacitación y dosificación del espermatozoide

Las gametas masculinas también deberán ser sometidas a una capacitación de una duración aproximada de 2 horas. El semen se almacenará en pajuelas, sumergidas en tanques de nitrógeno líquido a -196°C. El proceso de descongelar el semen es simple y rápido, se realiza a 39°C durante 45seg. El objetivo de capacitar al espermatozoide es imitar, de forma in-vitro, lo que ocurre en el tracto reproductivo femenino. La capacitación espermática es el conjunto de cambios fisiológicos que sufre un espermatozoide, de forma natural, para adquirir la capacidad de fecundar a la gameta femenina. Entre los cambios que se destacan se incluye: la modificación en el patrón de movimiento del espermatozoide y en la composición de su membrana para adquirir la capacidad de fusionarse con el óvulo y de poder llevar a cabo la reacción de acrosoma. (Gonzalez J, 2013).

Los métodos que se utilizan para el lavado y selección de espermatozoides motiles son Swim Up o Percol; ambas técnicas permiten separar el espermatozoide del líquido seminal y del diluyente, para obtener así un 70% de espermatozoides con motilidad rectilínea uniforme.



Imágen 5: Semen congelado en pajuelas, en términos de Nitrógeno líquido a -196°C

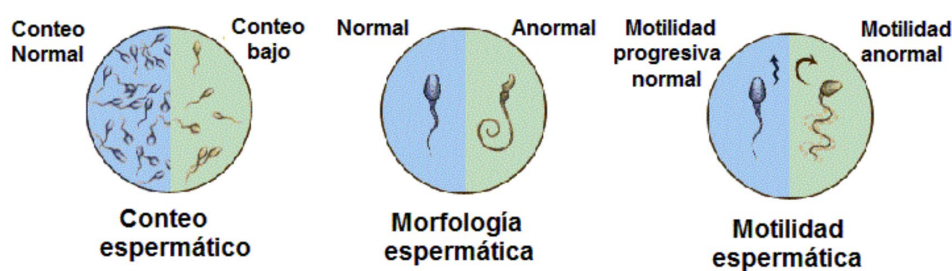


Figura 10: Evaluación macroscópica de la motilidad del semen

La técnica de Swim Up es la más utilizada para seleccionar y capacitar espermatozoides in vitro, la muestra de semen se centrifuga alrededor de 10 minutos, se la deja decantar, y se le agrega un medio de cultivo para luego dejarlo incubar por 45 minutos a 37°C . El objetivo es que aquellos espermatozoides con mayor movilidad lleguen a la superficie y que todo lo demás decante y se quede en el fondo. De esta forma se logra extraer los espermatozoides de la superficie, y la fracción resultante es limpia. Actualmente es la técnica más utilizada en laboratorios de FIV, se consiguen fracciones con más del 90% de espermatozoides con calidad A+B y los citados espermatozoides se encuentran en contacto con el debris celular (Boomsma CM et al., 2007).

La capacitación espermática permite adquirir hipermotilidad para avanzar por las trompas uterinas, penetrar el cumulus y prepararse para la reacción acrosómica. Bioquímicamente, es importante el aumento de pH para la capacitación espermática.

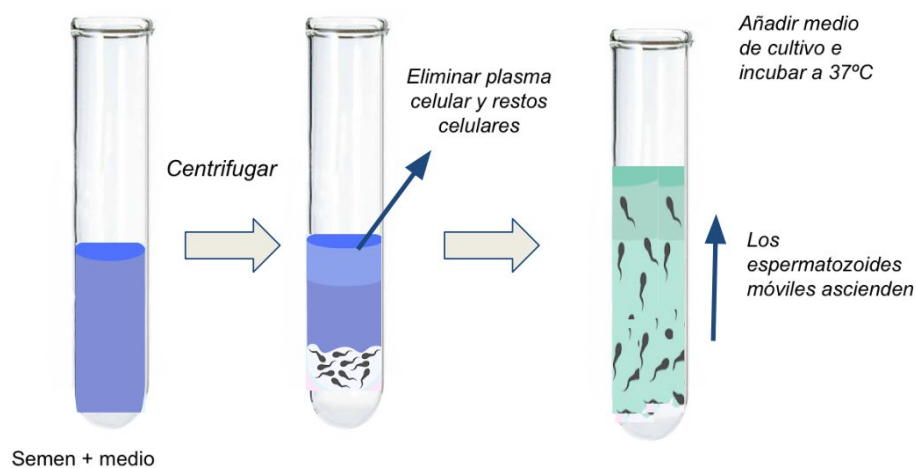


Figura 11: Capacitación espermática con Swim up (Rodrigo A., 2016)

La concentración del semen para la FIV dependerá de la especie, pero será un factor determinante para evitar la polispermia y lograr un clivaje exitoso. En condiciones normales, la zona pelúcida se hace responsable de bloquear la polispermia, en condiciones in-vitro es más complicado controlar este factor, y por ello es muy importante hacer una buena dilución del semen a utilizar. La polispermia ocurre cuando múltiples espermatozoides se fusionan con el mismo óvulo, habrá fusión, pero la segregación cromosómica será defectuosa. En consecuencia, esto hará que a la hora de la división celular se formarán células que no serán diplomes, y harán que el crecimiento sea inviable y se detenga, el desarrollo del cigoto no prolongará.

Una vez que los ovocitos fueron madurados y los espermatozoides capacitados, se lleva a cabo la fusión de ambas, en condiciones in vitro. Se utilizará una concentración estándar de espermatozoides, se mantendrán a las gametas en todo momento a una temperatura de 37°C, correspondientes a las del útero y testículos, evitando cambios bruscos que comprometan la viabilidad de las mismas.

4.8 Producción de embriones in vitro (PIV)

El éxito de la fecundación se demuestra a partir de los embriones logrados por hembra. Una vez fecundado el óvulo, como podemos observar en la figura 12 con un ejemplo en vacas, comenzará el desarrollo embrionario. La primera etapa será la división celular mitótica, donde aproximadamente al día 3 a 4 tendrá un número elevado de células, y se

lo llamará mórula. Las divisiones celulares no cesan, pero cuando se adquiere una forma determinada y comienza la diferenciación celular, aproximadamente entre los días 5 y 6, se lo llamará blastocisto. Los diferentes estadios del desarrollo embrionario ocurren en el oviducto, una vez que el blastocisto llega al útero tendrá lugar la implantación embrionaria aproximadamente en el día 7 y 8. Cuando se lleva a cabo la FIV, se busca llegar al mismo objetivo, llegar a un estado de blastocisto exitoso de aproximadamente 7 días con el fin de poder sincronizar una receptora hormonalmente, y de esta forma lograr la implantación exitosa entre los días 7 y 8.

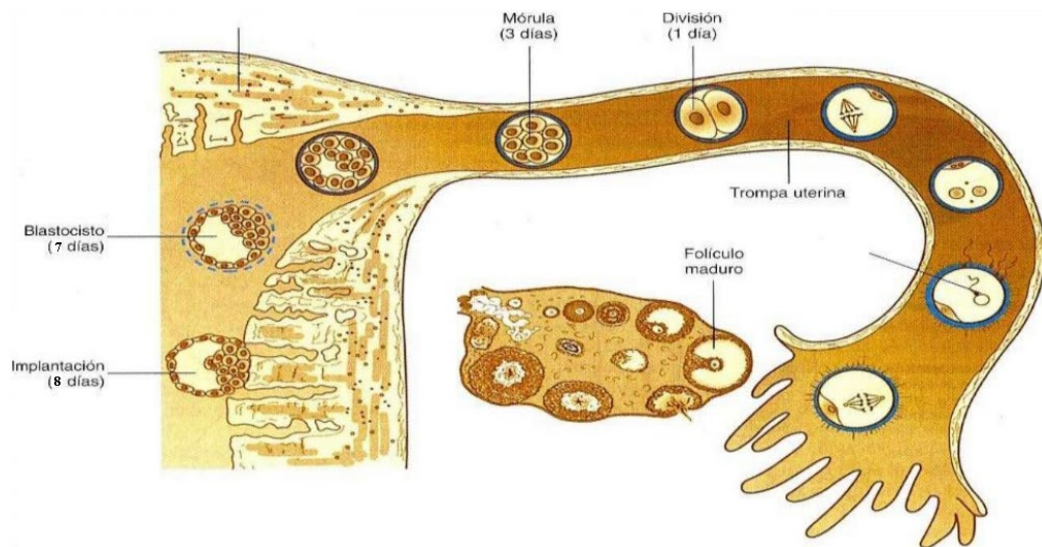


Figura 12: Fecundación y desarrollo embrionario en bovinos. (Mamarin B, 2013)

El éxito de la FIV y futura producción de embriones depende de varios factores, ya que no es fácil lograr un clivaje elevado. Solo los oocitos que han madurado correctamente podrán ser fecundados, desarrollarse normalmente hasta el estadio preimplantacional y dar origen a fetos viables para luego ser transferidos a madres receptoras (Chang 1955, Murkherjee, 1972; Moor y Trounson, 1980; Schroeder y Eppig, 1984; Van Blerkom, 1985).

5. Materiales y Métodos

5.1 Condiciones de campo

Ubicación: El estudio experimental fue realizado por técnicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, y el Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA). El estudio fue realizado dentro del marco de financiación del Ministerio de Ciencia y Técnica a través de sus subsidios PICT y los programas de apoyo a la investigación científica de ambas Universidades.

Los rodeos experimentales estuvieron ubicados en 3 establecimientos de la provincia de Corrientes, con una distancia entre establecimientos de aproximadamente 200 km. El sistema de manejo de bubalinos fue similar en los 3 establecimientos, con condiciones extensivas de pastoreo en potreros de tipo “humedal” e idéntico plan sanitario implementado por los mismos profesionales pertenecientes a UNNE.

Animales utilizados en el estudio: en todos los establecimientos, los rodeos disponibles para ensayos de investigación estuvieron conformados por hembras donantes de raza Mediterránea, Murrah y sus cruza; todos los animales seleccionados para el ensayo poseían fertilidad comprobada (al menos una cría nacida), edades entre 4 y 12 años y estado corporal con escore entre 3-4 (escala 1 al 5) al momento de la realización del ensayo. Los animales fueron incorporados a los tratamientos en forma aleatoria

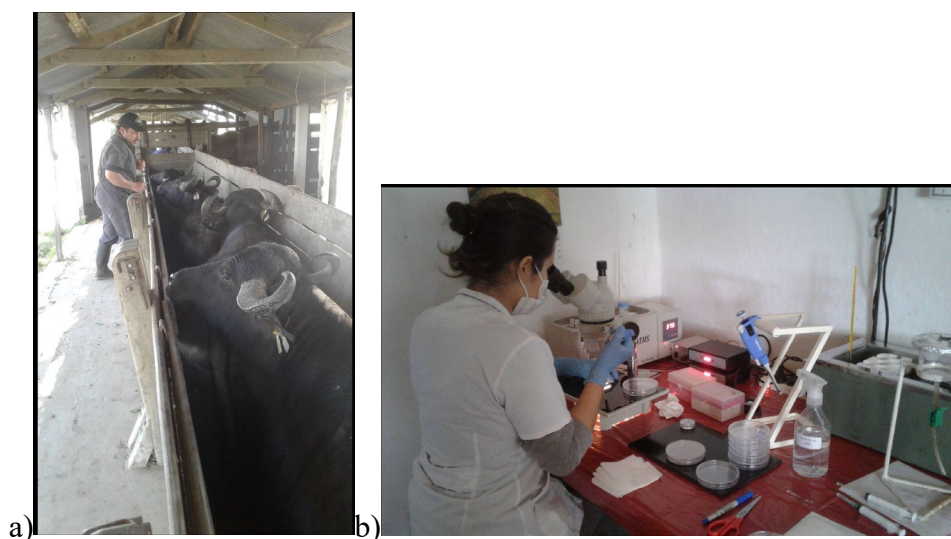
Establecimiento No. 1: Las Tilitas. Ubicación: Corrientes, Argentina. Lat -27.122; Long -57.992). Época de trabajo - Invierno, Agosto-Septiembre.

Establecimiento No. 2: San José. Ubicación: Itatí, Corrientes. Lat. -27.271; Long -58.242. Época de trabajo: Primavera, Noviembre-Diciembre.

Establecimiento No. 3: Little Punjab. Ubicación: Paso Florentín, Corrientes, Lat -27.747; Long -57.773. Época de trabajo: Verano/Otoño, Marzo-Abril.



***Imagen 6:** Trabajo en manga con búfalas, procedimiento de OPU con ultrasonido con escáner micro convexo de 5 MHz. (Fuente: Imágenes tomadas en el Campo Las Tilitas, gentileza M.V. María José Garrido).*



***Imagen 7:** a) Búfalas donantes en manga. b) Imagen de laboratorio, clasificación ovocitaria. (Fuente: Imágenes tomadas en el Campo Las Tilitas, gentileza M.V. María José Garrido).*

Tratamientos: Los animales fueron asignados aleatoriamente a tratamientos de aspiración folicular transvaginal cada 7 o 14 días. Se realizaron un total de 5 sesiones de OPU por grupo.

Procedimiento de ‘Ovum Pick Up’: Todos los procedimientos realizados de aspiración folicular fueron aprobados por el comité de bienestar animal (Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina). A fin de lograr la inmovilización de la búfala y facilidad de manejo, se administró xilacina 2% (Rompun, 0.25ml/100kg de peso vivo). Seguidamente, se administró procaina (Procasel 2%, 5-7 ml) por vía epidural. Para la OPU, se utilizó un ecógrafo Mindray DP-30 de uso veterinario, con escáner micro convexo de 5 MHz equipado con una guía transvaginal de 60 cm y una aguja 17G

desechable (0.9 x 70mm, WTA, Brasil). La presión de vacío utilizada para la aspiración folicular fue de 50 mmHg, la cual se mantuvo constante durante todo el período de aspiración. Por último, el fluido folicular fue recolectado en tubos de polipropileno de 50ml (Corning® Life sciences, MA, USA) precalentados a una temperatura de 37°C.

Inmediatamente previo a la punción, se utilizó el ecógrafo para la medición del diámetro de todos los folículos ováricos presentes y se identificó también la presencia de cuerpos lúteos al momento de la aspiración. El fluido folicular obtenido por cada animal fue recogido en tubos de 50 ml, los restos de sangre fueron eliminados por continuos lavados en PBS fresco y en última instancia se pasaron a una placa de petri para localizar y evaluar morfológicamente bajo microscopio los complejos Cumulus-ovocito (COCs) aspirados. Una vez finalizada la OPU, los ovocitos fueron transportados en una micro incubadora de embriones (Minutube, Alemania) a 37°C y en medio de maduración, en ómnibus al laboratorio de Reproducción Animal de la facultad de Ciencias Agrarias, (UCA, Buenos Aires, Argentina). (Dr. Salvador Ruiz López, 2010, '*Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la Reproducción*')

5.2 Evaluación de calidad ovocitaria

Para la evaluación morfológica de los COCs se tomó en cuenta el citoplasma y el número de capas de células del cumulus presentes al momento de la recuperación por OPU. Un citoplasma homogéneo y oscuro es indicador de un desarrollo óptimo. Un cumulus formado por sucesivas capas compactas, representa un mayor % de viabilidad, en cuanto a los futuros procesos de maduración fecundación y desarrollo del material germinal.

5.2.1 Clasificación Morfológica

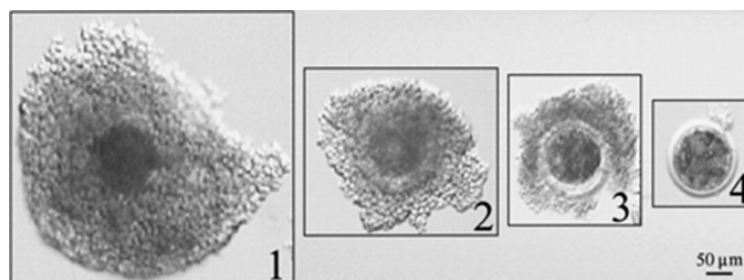
La clasificación ovocitaria fue realizada según los COCs del IETS, el rango utilizado es de Grado 1 a Grado 4 siendo Grado 1 y 2 de buena calidad y grado 3 y 4 de peor calidad.

Grado 1: Ovocito con más de 4 capas, cumulus compacto, citoplasma homogéneo e uniformemente granulado.

Grado 2: Ovocitos con monocapa de células del cumulus y citoplasma de apariencia irregular con áreas oscuras.

Grado 3: Ovocitos sin cúmulos, sólo rodeados por la corona radiata.

Grado 4: Ovocitos desnudos, sin cumulus.



Imágen 8: Clasificación de COCs según IETS (Stringfellow D, Givens, D, 2011).

La evaluación del tamaño de los ovocitos recolectados se midió, utilizando una clasificación de 3 intervalos; Diámetro < 3mm, Diámetro de 3-8mm y Diámetro >8mm. Esta clasificación permite comparar los valores de observaciones foliculares realizadas previamente en búfalos. (Konrad et al., 2013, 2016.)

5.3 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa de INFOSTAT, utilizando el test de Anova y posterior Test de Tukey para destacar las comparaciones. Se consideraron a su vez, diferencias significativas en un nivel de $p < 0,05$.

Variable Independiente: Época del año e intervalo entre OPU (7 y 14 días).

Variable Dependiente: El número de ovocitos recuperados, el número de ovocitos total recuperado, número de ovocitos discriminados según calidad (Grados 1, 2, 3 y 4).

Experimento 1: Se evaluó la influencia de la estacionalidad de las búfalas, a fin de determinar el impacto de realizar OPU en diferentes épocas del año sobre la recuperación total de ovocitos. En cada establecimiento se realizó la técnica de OPU en diferentes intervalos (7 días versus 14 días).

Experimento 2: Durante el período de Otoño, se realizó un mapeo ovárico, evaluando el diámetro promedio de aquellos ovocitos recolectados en intervalos de 7 y 14 días.

6. Resultados

6.1 Experimento 1:

Tabla 1: Efecto de la época del año sobre la cantidad de ovocitos recuperados por OPU en Bubalus bubalis.

Época del año	N° animales punzados/sesión	Total de ovocitos punzados (Media +/- EE)	Total Ovocitos de alta calidad G1-G2 (Media +/- EE)	Total Ovocitos de alta calidad G3-G4 (Media +/- EE)
Primavera	10	19,33 (+/- 6,72) A	3,37 (+/- 1,79) A	15,67 (+/- 6,17) A
Verano/otoño	10	35,33(+/- 4,75) AB	6,75 (+/- 1,55) A	28,50 (+/- 4,36) AB
Invierno	10	52,00 (+/- 5,82) B	6,83 (+/- 1,27) A	45,5 (+/- 5,35) B

(Medias con letra común no son significativa diferentes $p>0,05$)

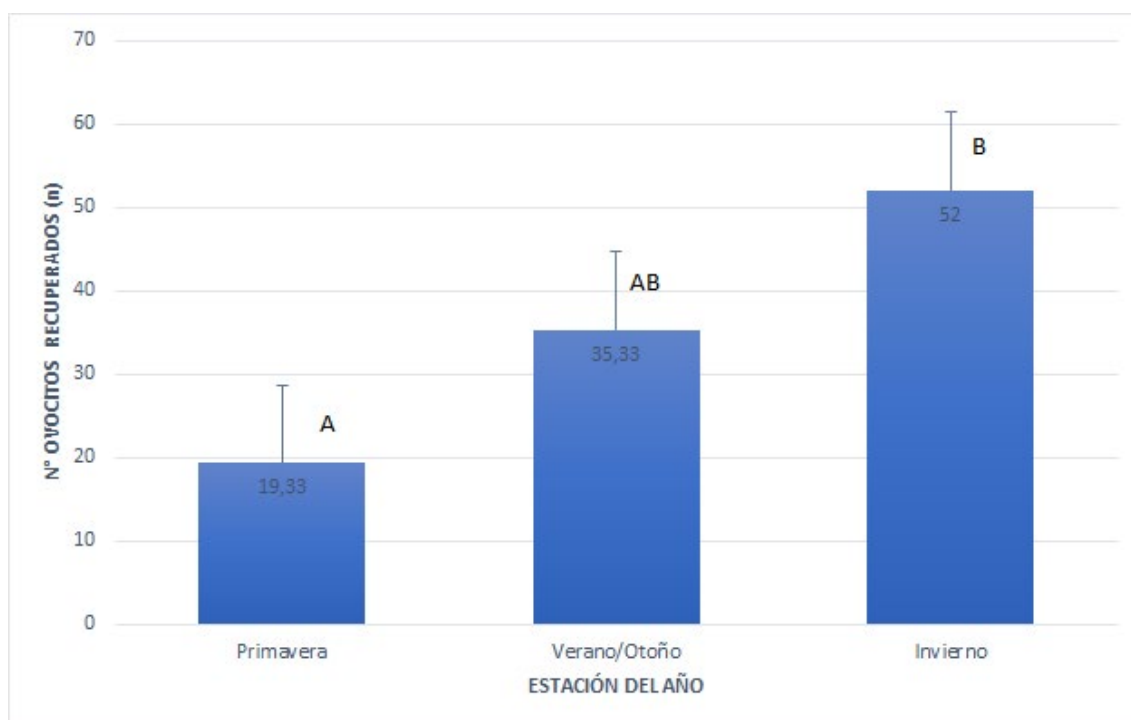


Gráfico 1: Media de ovocitos recuperados en Bubalus bubalis, por sesión de OPU en diferentes épocas del año. (Medias con letra común no son significativa diferentes $p>0,05$).

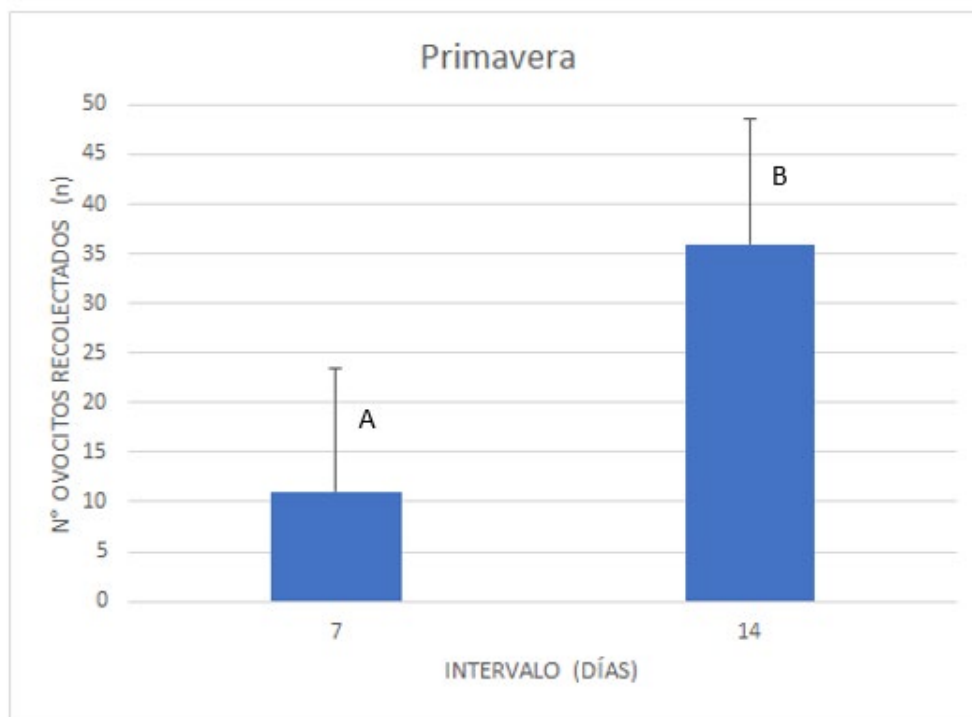
La época del año, como podemos ver en el Gráfico 1 y Tabla 1, ha sido un factor de relevancia sobre el total de ovocitos recolectados/sesión/hembra. Los resultados demostraron que existen diferencias significativas ($p\text{-valor}<0,05$) entre el período cíclico durante el invierno y el período no cíclico durante la primavera, en la recolección ovocitaria total por sesión de OPU. Se destaca también, una interesante recolección de

ovocitos totales en verano/otoño, que pareciera tener un resultado efectivo similar al de las intervenciones del invierno. El promedio se ha medido con un total de 10 hembras/sesión de OPU sacando un promedio de recolección ovocitaria de total de hembras tratadas/ sesión.

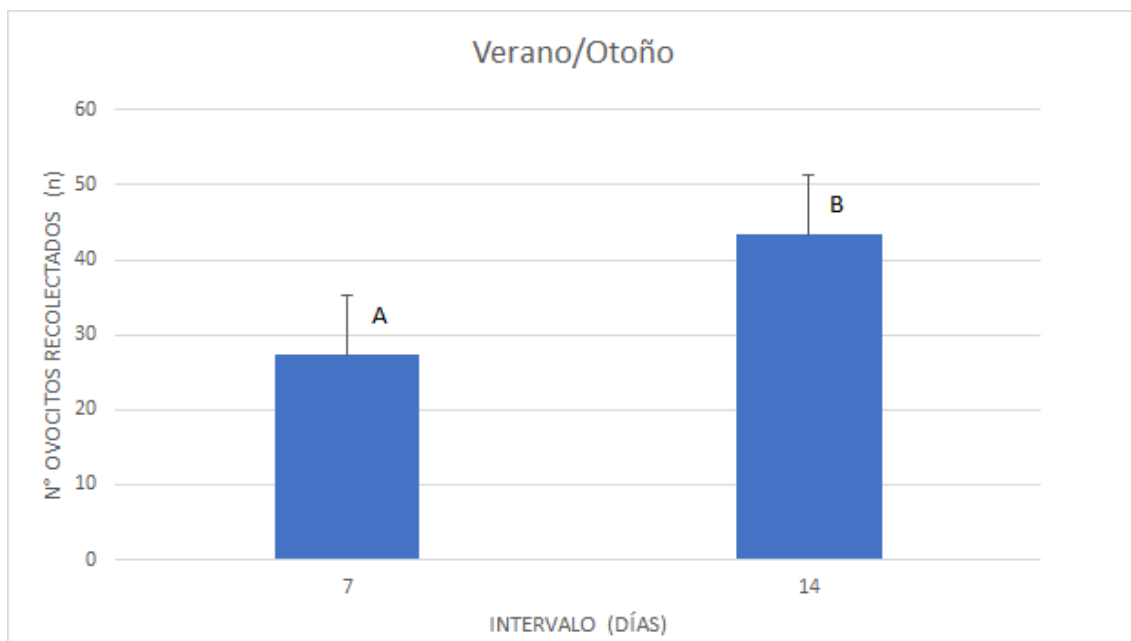
A continuación, se evaluó el efecto del intervalo entre las sesiones de OPU en cada uno de los períodos del año. Se realizaron comparaciones de 7 y 14 días de intervalo entre OPU, para evaluar el total de ovocitos recolectados.

Gráfico 2: Efecto del intervalo entre OPU (7 vs. 14 días) sobre el total de ovocitos recolectados en Bubalus bubalis. (Medias con letra común no son significativamente diferentes $p > 0,05$).

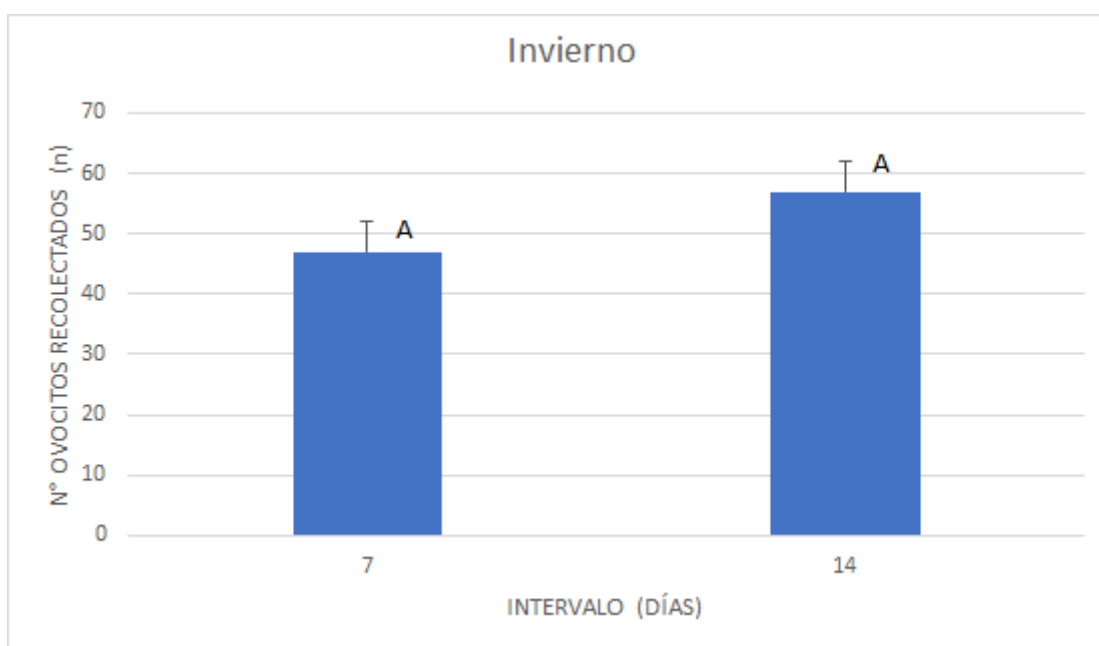
a) Primavera



b) Verano/Otoño



c) Invierno



En la parte experimental, también hicimos una evaluación del efecto que tiene el intervalo entre OPU sobre la recuperación ovocitaria en las diferentes estaciones del año. En el gráfico 2 a)b)c) se observó que durante el período no cíclico, en la primavera y en la transición de verano/otoño, la recuperación ovárica a la punción folicular no ha demostrado ser rápida, encontrándose efecto significativo del intervalo entre punciones. Las intervenciones cada 14 días resultaron en significativamente mayor cantidad de ovocitos recuperados por sesión. Por el otro lado, en el período cíclico de invierno, la recuperación ovárica ha sido mayor, de tal forma que no existieron diferencias

significativas entre ambos tratamientos, permitiendo intervenir cada 7 días con éxito y recolectando una mayor cantidad de ovocitos en un menor período de tiempo.

6.2 Análisis de Calidad Ovocitaria

En cada uno de los tratamientos, se evaluó bajo lupa estereoscópica (50x) la calidad ovocitaria recolectada, diferenciando los ovocitos entre G1-G2 como los de alta calidad y los G3-G4 como los de baja calidad. Los resultados se detallan a continuación.

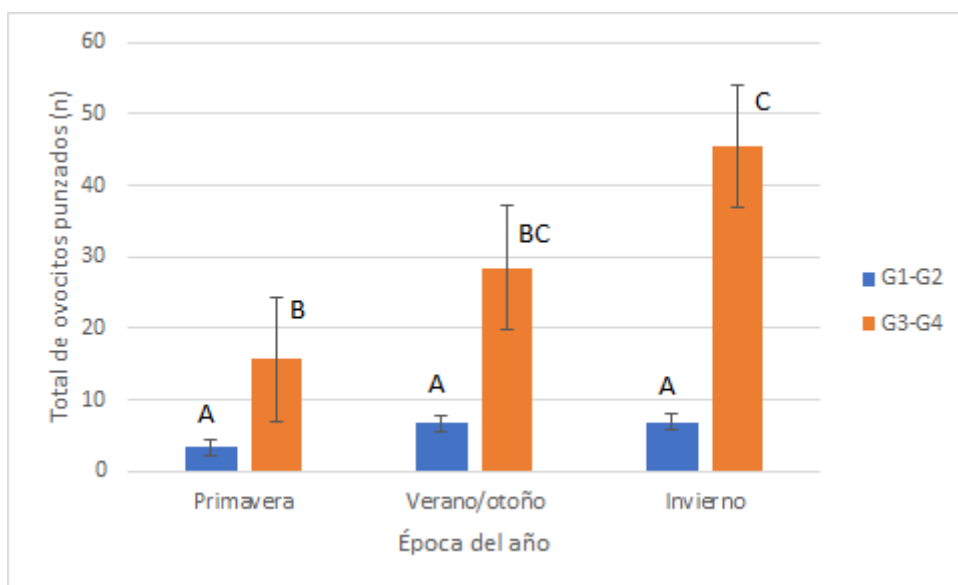


Gráfico 3: Efecto de la estacionalidad en la calidad ovocitaria. (Medias con letra común no son significativa diferentes $p > 0,05$).

Los resultados en el gráfico 3 indican que en el promedio de todas las sesiones, la proporción de COCs de baja calidad es superior a la de menor calidad en una relación de 1:3 (G1-G2: G3-G4). Es interesante destacar que, a lo largo de las diferentes épocas del año, no hay diferencias significativas entre los ovocitos de calidad, G1-G2 recolectados. Todo pareciera indicar que el grueso de las diferencias entre cada una de las recolecciones se debe al aumento de ovocitos G3-G4.

6.3 Mapeo Ovárico

En el establecimiento de Little Punjab, donde las hembras fueron sometidas a OPU durante el verano-otoño, se complementa la investigación con un mapeo ecográfico ovárico, para evaluar el tamaño promedio de los folículos aspirados en OPUs realizadas a intervalos de 7 días vs. 14 días. Se tomó como dato referente el promedio de ovocitos recolectados de las 10 hembras sometidas al tratamiento, en cada uno de los intervalos de 7 y 14 días.

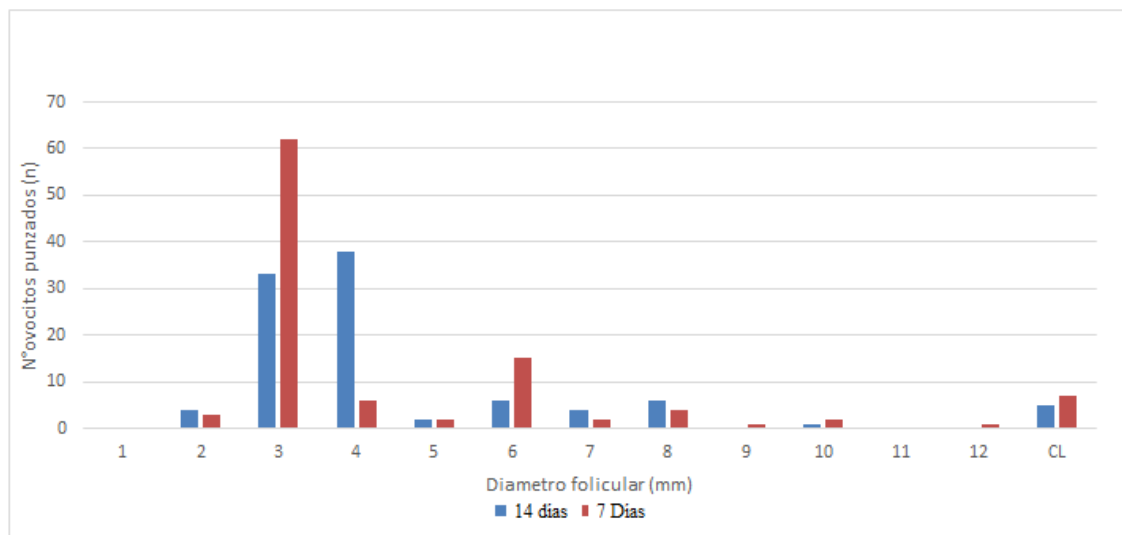


Gráfico 4: Efecto del intervalo de intervención sobre el diámetro folicular de las búfalas.

Se obtuvo el promedio del total de los ovocitos recolectados de las 10 hembras sometidas a las sucesivas intervenciones de OPU, en 7 y 14 días. Durante el verano/otoño el total de ovocitos recolectados/sesión, en las 10 hembras sometidas a OPU, fue de 99 ovocitos/sesión de OPU para aquellos intervalos entre sesiones de 7 días, mientras que para intervenciones cada 14 días fue de 105 ovocitos/sesión de OPU.

El mapeo ovárico permite observar una fotografía de lo que deberíamos encontrar en el ovario de la hembra a la hora de intervenir. En la época de transición vernal (hacia el otoño) la hembra estaría acercándose a entrar en el período de ciclicidad. La tendencia pareciera indicar que, con intervalos de punción más cortos, el diámetro de los folículos recolectados es menor, con un promedio de 3 mm para intervenciones a los 7 días, y un promedio de entre 4 mm al duplicar el período de intervención.

7. Discusión

Los experimentos realizados, a fin de evaluar la respuesta de la búfala a sucesivas intervenciones de OPU durante el periodo cíclico y el no cíclico, fueron exitosos. La estacionalidad, ha demostrado tener efecto sobre la dinámica folicular y la actividad ovárica en las hembras bubalinas. El período de ciclicidad de la hembra, durante el invierno, fue el momento óptimo para realizar intervenciones en intervalos cortos de 7 días y obtener un total de ovocitos/hembra/sesión elevado.

Según Boni et al (2012), la OPU es una herramienta que se utiliza con el objetivo de interferir en la dinámica folicular. Esto se debe a que al intervenir en períodos de tiempo lo suficientemente cortos, no habría ovulación y por ende no se inhibiría el desarrollo folicular. En los intervalos cortos entre sesión, la población folicular se resetea y la media folicular tiene un diámetro $<3\text{mm}$, como se observa en el gráfico 4 de los resultados experimentales de nuestro trabajo, asegurando que la nueva población de folículos aspirados probablemente tenga menos atresia y sea más homogénea en tamaño (Boni et al., 1995). El folículo dominante reduce la capacidad de desarrollo de ovocitos de folículos subordinados, incluso durante la fase de dominancia relativamente tardía (Hendriksen y col., 1994). Puede asumirse entonces que el folículo dominante será eliminado en cada sesión o inhibido en su aparición y por consiguiente se estimulará una nueva onda folicular de folículos pequeños (Bergfelt y col., 1994).

El presente trabajo ha demostrado diferencias en la actividad ovárica dentro y fuera de la temporada reproductiva. La recuperación del ovario fuera de la temporada reproductiva fue más lenta en la cual las intervenciones cada 14 días permitieron mostrar mejores resultados en cantidad de ovocitos totales recolectados. A pesar de ello, no hubo mayores diferencias en la recolección de ovocitos de alta calidad entre las diferentes intervenciones. En éste sentido, es interesante ver cómo en cada intervención de OPU el total de ovocitos de calidad recolectados es bajo, sin haber diferencias significativas entre las diferentes épocas del año. La recolección de ovocitos de calidad no ha variado, mientras que la diferencia en la recolección de ovocitos totales ha sido mayor en la temporada reproductiva, por un aumento en la recolección de ovocitos de baja calidad, que según los investigadores, no son los ovocitos buscados para lograr embriones viables (Konrad et al., 2013).

Varios reportes indican que la calidad del ovocito es el factor de mayor peso en la tasa de producción de embriones por fertilización in vitro, particularmente la proporción de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (Rizos et al, 2002). Los resultados obtenidos demuestran que la calidad inicial del ovocito bubalino (grados 1-2 vs grados 3-4) tuvo un efecto significativo sobre la proporción de ovocitos madurados. Estos resultados preliminares indicarían una mayor susceptibilidad del ovocito bubalino durante la maduración in vitro, razón por la cual podría ser necesario y más estricta la selección de la calidad de los ovocitos para su maduración y posterior fertilización in vitro. (Konrad J et al). Numerosos experimentos con ovocitos obtenidos de matadero, explicaron que no todos los ovocitos tienen la misma capacidad de desarrollo, sino que ésta depende del estado del ciclo (Machatkova, 1995), edad (Bols y col., 1999), estado fisiológico (Moreno y col., 1993) y variaciones individuales de las donantes (Sosnowski y col 1996). Estos hallazgos tienen serias implicancias en los programas de recolección al igual que en los futuros programas de producción de embriones, con previa utilización de la OPU/FIV. (Bols y col 1996). Se han evaluado también, los parámetros genéticos en bovinos para estimar la heredabilidad de la cantidad de COCs recolectados en cada sesión de OPU y fue de aproximadamente 0.25 (Merton et al 2009). Como existe una correlación positiva entre el número de folículos punzados y el número de COCs recolectados por OPU, se podría esperar que la heredabilidad de los folículos punzados podría llegar a un número parecido (Boni et al 2012). Si se pudiera confirmar la hipótesis, entonces se debería tener en cuenta estas características en los programas de cruzamiento, para mejorar la performance de aquellas hembras seleccionadas.

La OPU es uno de los factores determinantes a la hora de establecer el éxito de la producción de embriones in vitro, ya que es el eslabón fundamental para obtener la materia prima. De ella dependen la calidad y cantidad del material recuperado y serán de suma relevancia a la hora de lograr una recolección total de COCs elevado. En efecto, el intervalo entre OPU es un factor que permite optimizar recursos, aumentar el total de ovocitos recolectados/ hembra/sesión en un período de tiempo determinado. Buenos resultados en la OPU permiten mejorar los resultados en laboratorio. En definitiva, según Boni et al., 2012 realizar la OPU una vez por semana/ hembra, no es un tiempo suficiente para poder proveer a la técnica de IVEP con la suficiente cantidad de ovocitos de calidad para la futura producción de embriones viables. Los factores que dificultan el estudio de

la técnica y la posibilidad de lograr embriones viables, incluyen la población heterogénea de ovocitos que se encuentran dentro del ovario de una hembra; no solo heterogénea en tamaño sino también en lo referido a calidad y grado de madurez. Si bien el total de ovocitos recolectados aumenta durante el invierno, no todos llegan al estadio de blastocisto y por eso son necesarias las sucesivas recolecciones. La principal limitante de la IVEP está en poder llevar la técnica a grande escala.

8. Conclusión

Los experimentos realizados, a fin de evaluar la respuesta de la búfala a las intervenciones de OPU durante el periodo cíclico y el no cíclico, fueron exitosos. El estudio buscó demostrar el período óptimo para llevar a cabo las intervenciones de OPU. Para ello fue importante poder evaluar la respuesta de los animales a intervenciones de aspiración folicular en diferentes épocas del año, y con diferentes intervalos. Se observaron diferencias en los resultados, principalmente en el total de ovocitos recolectados durante la temporada reproductiva a comparación de la no reproductiva. Por otro lado, no hubieron grandes diferencias en lo que respecta a la recolección de ovocitos de calidad G1 y G2 principalmente porque la recolección de ovocitos de calidad en cada una de las sesiones fue baja sin mayores diferencias, pero el grueso de las diferencias se concentró en la recolección de ovocitos de mala calidad. Como el objetivo final de la combinación de OPU/FIV/IVEP es lograr la producción de embriones viables en condiciones de laboratorio, se llegó a la conclusión de que los ovocitos de buena calidad se recolectan en cualquier período del año, sin haber diferencias significativas. Este hallazgo es importante, ya que de ello se infiere que se podría intervenir dentro y fuera de la temporada reproductiva para producir embriones in vitro.

En cuanto a los intervalos de OPU fuera de la temporada reproductiva, conviene utilizar intervalos de 14 días para aumentar la recolección ovocitaria, mientras que en la época de ciclicidad, en las intervenciones cada 7 días, se obtuvieron buenos resultados. Lo que se pudo inferir es que la recuperación ovárica en el período cíclico permite intervenciones en períodos cortos, y que la respuesta ovárica para el desarrollo folicular es más dinámica debido quizá, a la presencia de la FSH en mayor concentración (aunque esto no pudo corroborarse en el presente experimento debido a que no se contó con la posibilidad ni recursos para extracción de sangre y análisis de niveles de gonadotropinas circulantes). Por el contrario, fuera de la temporada reproductiva la recuperación ovárica pareciera necesitar más tiempo, y esto también podría estar ligado a la menor concentración de FSH.

En definitiva, la OPU plantea nuevas alternativas para la reproducción asistida en animales poliéstricos estacionales de fotoperiodo negativo como *Bubalus bubalis*, los resultados son exitosos fuera y dentro de la temporada reproductiva.

9. Agradecimientos

A todas aquellas personas que han sido parte de este camino. Que me han apoyado y acompañado en todo momento. Especialmente a mi familia y amigas de siempre, que estuvieron desde el principio hasta el final. Ha sido un lindo y largo camino, conociendo colegas, compañeros y profesionales.

A mi tutora Marina Sansinena que ha tenido la paciencia y la energía para empujarme a terminar. Gracias a todo el equipo de laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias (UCA), por brindarme el apoyo, el material y la paciencia para poder llevar a cabo mi tesis de grado. Ha sido un gran camino recorrido, fue un gusto conocerlos y aprender de ustedes.

Gracias a todas los profesionales de las cabañas bubalinas involucradas en la recolección de datos: Little Punjab, Las Tilitas y San José, Corrientes. Su gran trabajo y desempeño a campo, ha sido fundamental en la finalización de éste trabajo.

10. Bibliografía

Awasthi M.K., Khare A., Kavani F.S., Siddiquee G.M., Panchal M.T., Shah R.R. 2006. Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in water buffaloes (*Bubalus bubalis*)?. *Anim Reprod Sci* 92: 241-253.

Baruselli P.S., Mucciolo R.G., Visintin J.A., Viana W.G., Arruda R.P., Madureira E.H., Oliveira C.A., Molero-Filho J.R. 1997. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 47: 1531-1547.

Baruselli, P.S. Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. *Buffalo J.*, Suppl. 2, p. 53-60, 1994a

Baruselli, P.S. Control farmacológico del ciclo estral y de la superovulación en bubalinos. En: *Control Farmacológico del Ciclo Estral en Rumiantes*. Universidad de San Pablo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Reproducción Animal, p 190-254. 2000.

Baruselli, P.S. Foliculogénesis in buffalo. *Bubalus bubalis*, v.4, p. 79-92, 1997. (supplement 4)

Baruselli, P.S.; Mucciolo, R.G.; Amaral, R.; Arruda, R.; Assumpção, M.E.O.A.; Madureira, E.H.; Visintin, J.A. Taxa de recuperação embrionária em búfalas superovuladas In: *Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Transferência De Embriões*, 13., Atibaia. *Arq.Fac.Vet.UFRGS*, v.26, p.229, 1998.

Bieli, Alejandro; *Veterinaria (Montev.)* vol.52 no.202 Montevideo, mayo 2016
“Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos” http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-48092016000200002&script=sci_arttext&tlng=en

Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD004507. Review.)

Campanile G., Baruselli P.S., Neglia G., Vecchio D., Gasparini B., Gimenes L.U., Zicarelli L., D'occhio M.J. 2010 Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim Reprod Sci* 121: 1-11.

Drost M. 2007. Bubaline versus bovine reproduction. Theriogenology 68: 447-449.

Dr. Salvador Ruiz López, 2010, ‘Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la Reproducción’

https://www.researchgate.net/publication/260359949_Ovum_Pick_Up_OPU_en_bovinos_Aplicaciones_en_Biotecnologia_de_la_Reproduccion (Universidad Pablo de Olavide: Tecnología de la Reproducción y Terapia Génica) y Semen preparation techniques for intrauterine insemination.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P. Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology. 55: 1341-1357. 2001.

Gonzalez J. Análisis de programas y protocolos de preparación de hembras bovinas para la realización de OPU en la obtención de ovocitos para FIV. IN; Junio 2013; Oviedo. p. 1-32.

Gustavo A. Palma, Biotecnología de la reproducción, Mar del Plata, 2da edición, 2008.

G.Ybran, Romina. INTA, 2016 “ Informe estadístico del mercado de la soja”

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_informe_estadistico_del_mercado_de_soja.pdf

Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S, Fernández M. Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch Latinoam Prod Anim. 15: 1-8. 2007.

INIA - Madrid, 2016, ‘Reproducción asistida en bovinos usando Ovum Pick Up y FIV’) http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_11_50_8_CORDOBA.pdf

Konrad J, CONICET, 2014 ‘Fisiología de la Reproducción de la Búfala’

<https://fcvinta.files.wordpress.com/2014/03/06-konrad-fisiologc3ada-reproductiva-de-la-bufala.pdf>

Konrad, J.L; Scian, R; Garrido, M.J.; Taminelli, G.; Sansinena, M., Producción de embriones de búfalo por fertilización in vitro luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado.

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-68402013000200004

Lenz S, Lauritsen JG. Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia; a new method of collecting oocytes for in vitro fertilization. *Fert Steril*. 38: 673-677. 1982.

Mamarin B, 2013, “Transporte y viabilidad de los gametos”

<https://pt.slideshare.net/bulmamarin08/transporte-y-viabilidad-de-los-gametos/6?smtNoRedir=1>

Merton JS, ASk B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick in-vitro production embryo-production program. *Theriogenology*, 72:885-893.

Ojeda Rojas, Alejandro. Universidad Nacional de Córdoba, 2012. “Determinación de la dinamica folicular y el crecimiento y regresión del cuerpo lúteo de búfalas y buvillas de la raza murrah en el trópico bajo colombiano.”

<http://www.iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/Alejandro%20Ojeda%20Rojas%20-%20CGR%202007.pdf>

Perera B.M.A.O. 2011. Reproductive cycles of buffalo. *Anim Reprod Sci* 124: 194-199.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30:751-62. 1988.

Producción animal, 2017, ‘El búfalo promete’, Agritotal.

<http://www.agritotal.com/nota/el-bufalo-promete/>

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molec Reprod Dev* 61: 234-248.

Rodrigo Andrea, 2016, “¿Cómo es el proceso de la Fecundación in Vitro paso a paso?”

<https://www.reproduccionasistida.org/el-proceso-de-la-fecundacion-in-vitro/>

Ruiz S. Ovium Pick up (OPU) en bovinos. Aplicaciones en biotecnología de la reproducción. In; 200; Murcia. p 1-6.

Singh J., Nanda A.S., Adams G.P. 2000. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim Reprod Sci* 60-61: 593-604.

Terzano, Giuseppina Maria. Istituto Sperimentale per la Zootecnia (Animal Production Research Institute) Via Salaria 31, 00016 Monterotondo (Rome), Italy“Follicular dynamics and reproductive techniques in buffalo”