



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes - Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-

OPCION: PRODUCCIÓN ANIMAL

TEMA: “Evaluación de la fertilidad *in vitro* de semen bubalino (*Bubalus bubalis*)”.

TUTOR EXTERNO: Scarnatto, Raúl Enzo.

TUTOR INTERNO: Konrad, José Luis

RESIDENTE: Ponce, Pablo Exequiel.

E-mail: pabloexequiell998@gmail.com

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

La aplicación de biotecnologías en la especie bubalina, como la técnica de producción *in vitro* de embriones, tiene una limitada aplicación debido a diversos factores que afectan a la implementación de las mismas, siendo poco evaluado el efecto que tiene el semen de búfalo en estas técnicas. El objetivo del trabajo fue evaluar la fertilidad *in vitro* del semen de búfalo criopreservado con dos métodos de capacitación, y su potencial efecto en la producción de embriones. El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio “PREÑATEC S.R.L” del MV Scarnatto, Raúl Enzo, empresa que se dedica a la producción y transferencia de embriones obtenidos por la técnica de fertilización *in vitro*, ubicado en la ciudad de Corrientes capital. Se trabajó con semen congelado de un reproductor búfalo cruza carnicero, perteneciente a la Cabaña de Búfalos Pedro Antonio Silva (h), “Centro Integral de Inseminación Artificial Bubalina (CIIAB)”, del departamento de General Paz, Provincia de Corrientes. El trabajo consistió en realizar fertilización heteróloga, con ovarios de hembras vacunas obtenidos de matadero y semen de búfalo, el cual ha sido seleccionado por dos métodos de capacitación espermática distintos (método de lavado y gradiente de densidad de Percoll). Luego de la fertilización *in vitro*, los presuntos cigotos fueron llevados a cultivo durante 8 días, evaluando el clivaje y la producción de embriones a los 3 y 7 días, respectivamente, vitrificando los embriones de calidad excelente el día 7. La tasa de clivaje y producción total de embriones fue de 59 y 20%, respectivamente, para el semen capacitado por gradiente de Percoll, mientras que con el método de lavado se obtuvo una tasa de clivaje del 70% y una tasa de desarrollo de blastocistos del 23%. Al evaluar los resultados y realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos de capacitación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el semen de búfalo puede ser procesado por ambos métodos de capacitación espermática para la técnica de producción *in vitro* de embriones.

INTRODUCCIÓN

El búfalo doméstico es una especie introducida desde el continente asiático, agrupado dentro de la familia *Bovidae*, género *Bubalus*, especie *bubalis* (Crudeli *et al.*, 2016). El búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) tiene una gran importancia económica como proveedor de leche y carne en muchos países, especialmente asiáticos. La producción diaria de leche de las búfalas es mucho menor que la de vacunos, pero posee mayor contenido de grasa láctea (8%), mayor proporción de ácidos grasos insaturados, mayor cantidad de proteína láctea (4,5%) y menores niveles de fosfolípidos y colesterol, por lo que comparativamente tiene mayor valor nutricional (Zicarelli, 2004). La leche de búfala es una de las mejores materias primas para la fabricación de productos lácteos. Por ejemplo, el queso mozzarella, uno de los productos lácteos más conocidos en todo el mundo, está elaborado con leche de búfala Mediterránea italiana (De Camargo *et al.*, 2015). Por lo tanto, en muchos países el búfalo se considera una de las especies de animales de granja más importantes (Tantia *et al.*, 2008; Kale *et al.*, 2014). Es la segunda fuente de leche a nivel mundial (Nasr *et al.*, 2016) y contribuye aproximadamente con el 50% a la producción total de leche en Asia. Sin embargo, el búfalo proporciona solo el 13% de la producción mundial total de leche (FAO, 2020) debido a su rendimiento promedio mucho más bajo que el de las vacas Holstein (Nasr *et al.*, 2016).

El búfalo ingresó a la Argentina a comienzos del siglo XX, mediante la importación de razas Mediterránea, Murrah y Jafarabadi, todas de doble o incluso triple propósito (carne, leche y trabajo) (Crudeli *et al.*, 2021). De acuerdo a los datos oficiales aportados por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), la población de búfalos en Argentina en el año 2013 era de 87.711 cabezas y un total de 930 productores bubalinos (SENASA, 2013); actualmente existen en el país, según datos oficiales, 147.785 cabezas de búfalos y un total de 1.193 productores (SENASA, 2020), lo que significa un aumento del 68,4% en población de búfalos desde diciembre 2013 hasta marzo 2020.

La región del Nordeste Argentino (NEA), integrada por Corrientes, Formosa, Chaco, Misiones y Entre Ríos concentra el 88,89% de la población bubalina del país; la provincia de Corrientes es la que tiene el mayor número de cabezas de búfalos y cantidad de productores bufaleros. La Argentina presenta regiones inexploradas o explotadas ineficientemente desde el punto de vista pecuario, debido a la falta de

adaptación del ganado vacuno a la misma, como son los sectores bajos e inundables que totalizan unas ocho millones de hectáreas, las que pueden soportar una carga de un búfalo cada dos hectáreas, lo que permitiría una población de 4 millones de búfalos, que no competirán con el ganado tradicional, el cual tiene baja eficiencia productiva en estas zonas marginales. La cría de búfalos se ha destinado principalmente a la producción de carne, mientras que la producción de leche tiene muy escasa importancia tanto en cantidad y calidad, tratándose mayoritariamente de pequeños tambos familiares que la utilizan para elaboración de productos artesanales, como quesos mozzarella y de tipo criollo y también dulce de leche (Crudeli *et al.*, 2021).

La biotecnología de la reproducción ha experimentado un gran avance en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados, los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones (Peláez Peláez, 2011). El crecimiento que experimenta la producción bubalina hace necesario que vaya acompañado de un mejoramiento genético en la especie, especialmente mediante la aplicación de biotecnologías de la reproducción, como la inseminación artificial (IA), la múltiple ovulación (SOV) y transferencia de embriones (MOET) y la recolección de óvulos (ovum pick-up, OPU) combinada con la producción de embriones *in vitro* (IVP). A diferencia del ganado, el MOET no es comercialmente viable en el búfalo de agua debido al bajo número de embriones recuperados por sesión, probablemente debido a un defecto en la captura del ovocito por la fimbria y su transporte a través del oviducto (Baruselli *et al.*, 2018; Salzano *et al.*, 2018).

Por su maximización en la eficiencia de la utilización del germoplasma y por su efecto sobre el intervalo generacional, la fertilización *in vitro* (FIV) es una herramienta productiva de gran impacto en el progreso genético, en particular en aquellas especies donde la SOV presenta dificultades de implementación (Wilmot *et al.*, 2000). Esta es actualmente una de las herramientas más prometedoras para aumentar el número de embriones transferibles por donante (Sansiñena *et al.*, 2016), a pesar de que una de las principales limitantes para el establecimiento de programas de FIV comerciales en búfalos reside en el reducido número y la baja competencia de los ovocitos derivados de la aspiración folicular transvaginal (OPU) (Gasparrini, 2002). En los últimos años, los

trabajos fueron orientados a buscar mejorar esta limitante que presenta la especie mediante la aplicación de tratamientos de estimulación hormonal antes de la OPU, logrando un efecto positivo tanto en el número como en la calidad de los ovocitos obtenidos, traducándose en una mayor eficiencia en la producción de embriones (Sakaguchi *et al.*, 2019; De Carvalho *et al.*, 2019; Petrovas *et al.*, 2020). Sin embargo, pocas investigaciones fueron realizadas para evaluar el efecto del semen en la fertilización de ovocitos de búfalas. Para esto, se podrían realizar técnicas como la prueba de fertilización *in vitro* (FIV), la cual permite medir la capacidad fecundante del espermatozoide *in vitro* en presencia del gameto de la hembra, estos últimos pueden ser de la misma especie (homólogos) o de especies diferentes (heterólogos). Su importancia radicaría en lograr el conocimiento de la habilidad fecundante del semen de un reproductor (Allende y Arisnabarreta, 2021). La tasa de fertilización en vacunos ronda alrededor del 68% (Bastidas *et al.*, 1997; Galli *et al.*, 2003; Salgado *et al.*, 2005), sin embargo, Bastidas *et al.* (1997), realizando fertilización heteróloga encontraron que la tasa de fertilización era significativamente más baja en ovocitos de búfalos (47%). Los toros individuales difieren en su capacidad para fertilizar ovocitos *in vitro*, dependiendo de diferentes factores de los espermatozoides como ser motilidad, integridad de la membrana y el acrosoma y la capacidad de penetrar los ovocitos (Ward *et al.*, 2003).

En el vacuno, la fecundación *in vitro* de ovocitos homólogos es, sin lugar a dudas, el test más completo para evaluar la funcionalidad espermática, ya que permite valorar todas las fases del proceso de fecundación, desde el estado de capacitación espermática hasta la fusión con la membrana vitelina del ovocito o el inicio del desarrollo embrionario (Lonergan, 1994; Shamsuddin *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2002). Debido a la baja disponibilidad de ovarios de búfalas, ésta prueba, es factible de ser realizada con ovocitos de vacunos (heterólogos) (Scarnatto, 2022).

Entre los diversos factores que afectan la tasa de FIV, la calidad posterior a la descongelación de los espermatozoides de búfalo es de enorme importancia. El proceso de congelación y descongelación reduce en un 50% la viabilidad y motilidad de los espermatozoides. Para una fertilización exitosa, los espermatozoides deben estar intactos, viables, móviles, ya capacitados y listos para la reacción del acrosoma cuando entran en contacto con el ovocito. En caso de FIV, los espermatozoides se seleccionan utilizando métodos de laboratorio, de los cuales "swim-up" es una técnica comúnmente utilizada en ovinos, bovinos y búfalos. A pesar de que con esta técnica se seleccionan

espermatozoides con buena motilidad, es difícil recuperarlos en cantidad adecuada. Es relevante mencionar que el espermatozoide de búfalo tiene un alto contenido de ácidos grasos poli insaturados (PUFA) en su membrana plasmática. Los altos contenidos de los PUFA son más susceptibles a la peroxidación lipídica por el ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta en una disminución de la motilidad de los espermatozoides. También es imperativo mencionar que el swim-up selecciona los espermatozoides únicamente en base a la motilidad, mientras que otros factores como la integridad de la membrana y viabilidad son de inmensa importancia (Husna *et al.*, 2017).

Aunque en algunos estudios se ha encontrado una elevada correlación con la fertilidad *in vivo* de los toros (Hillery *et al.*, 1990; Marquant-Le Guenne *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2003), todavía se necesita una mayor estandarización de los métodos a la hora de aplicar dicha técnica, puesto que existe considerable variabilidad entre los resultados de FIV obtenidos para un mismo toro, debido a factores de variación como por ejemplo el método de selección de los espermatozoides (Percoll o swim-up) (Parrish *et al.*, 1995), de capacitación espermática *in vitro* (Saeki *et al.*, 1995) o el número de espermatozoides utilizado para la inseminación de los ovocitos (Kroetsch y Stubbings, 1992). La elección del macho para la FIV es una consideración clave en la IVP de búfalos, ya que diferentes toros pueden tener diferente fertilidad y, en consecuencia, tasas de desarrollo embrionario. De hecho, se ha sugerido que solo el 10% de los toros son aptos para la FIV en búfalos. Se ha demostrado que existe una gran variación en la cinética de fertilización entre toros en búfalos, con diferentes machos que requieren diferentes períodos de incubación para penetrar con éxito en los ovocitos, diferentes factores de capacitación y concentraciones de heparina, como así también distintas concentraciones de espermatozoide para poder desempeñarse de manera óptima. Esto sugiere que varios toros pueden requerir factores de capacitación específicamente adaptados a sus necesidades (Currin *et al.*, 2022).

En la FIV, la fertilización representa un paso muy crítico de todo el procedimiento que debe optimizarse. Se ha demostrado que la congelación da como resultado daño acrosomal, fuga de enzimas, alteraciones en la fuerza iónica y el pH, completa retirada de la capa de hidratación de proteínas en solución y pérdida de motilidad. También se demostró con estudios de microscopía electrónica, que la membrana plasmática de los espermatozoides de búfalo es más frágil, particularmente en la región acrosomal,

incluso se obtienen tasas de fertilización más altas cuando la FIV se realiza con semen fresco, pero su uso está limitado por su impracticabilidad. En el vacuno, se han desarrollado varios métodos para inducir la capacitación de los espermatozoides, mientras que en el búfalo, el procedimiento más exitoso implica el uso de heparina. Hay una alta variabilidad en la capacidad de fertilización de diferentes toros, que también depende de la concentración de heparina utilizada para la capacitación. La selección de espermatozoides móviles se puede llevar a cabo mediante el método de swim-up de 1 hora o un gradiente de densidad de Percoll. Medios básicos como el medio modificado de Tyrode (TALP) o Brackett y Oliphant (BO) han demostrado ser adecuados para FIV en búfalos. El progreso de la IVP, en general, se ha visto obstaculizado por la escasez de material experimental, es decir, ovarios de animales sacrificados para utilizar con fines de investigación en todos los países en los que se cría la especie (Gasparrini, 2002).

Aunque la FIV exitosa en búfalos se llevó a cabo mediante la separación de los espermatozoides del semen con la técnica de swim-up (Mehmood *et al.*, 2009), estudios realizados en vacunos sugieren lo contrario (Cesari *et al.*, 2006). Para esto, la determinación de la capacidad fecundante del espermatozoide es fundamental para optimizar los resultados de dichas biotecnologías (Gillan *et al.*, 2005).

Entre los sistemas más habituales para la preparación de esperma congelado de vacunos usados en programas de fecundación *in vitro*, destacan los siguientes: método de lavado por centrifugación, denominado también washing, gradiente de densidad de Percoll, filtración mediante columna de fibra de vidrio, y el método de migración/sedimentación. La técnica de selección espermática más ampliamente utilizada es la del lavado por centrifugación.

La utilización del gradiente de Percoll permite aislar hasta un 90% de los espermatozoides móviles, la eliminación de residuos tóxicos de crioprotectores y de los espermatozoides muertos, así como obtener un elevado porcentaje de espermatozoides con morfología normal y acrosomas íntegros (Ocaña Quero *et al.*, 1997). Percoll es un medio de gradiente de densidad que se compone de partículas de sílice coloidal con un diámetro de 15 a 30 nm que están recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). Los gradientes de densidad discontinuos para la separación de espermatozoides móviles e inmóviles han sido ampliamente adaptados para su uso en la fertilización *in vitro* en humanos, ganado y otras especies. La tasa de recuperación de

esperma es de alrededor del 50%, lo que es de 5 a 10 veces mayor que para un procedimiento de swim-up. La separación de esperma con Percoll es simple para llevar a cabo, y da como resultado fracciones de espermias altamente móviles y limpias.

El método de lavado presenta varias ventajas, es rápido, fácil de realizar, económico y se puede lograr una alta tasa de recuperación. La motilidad inicial después del lavado es ligeramente menor (70-80%) comparado con Percoll (80-90%), pero en 18 a 20 hs post inseminación, la motilidad después del lavado suele ser del 50% o más (Avery y Greve, 1995).

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la fertilidad *in vitro* del semen bubalino y su potencial efecto en la producción de embriones.

Objetivos específicos:

- Evaluar dos métodos de capacitación espermática en búfalos.
- Valorar la fertilización por medio de la observación del clivaje y producción de blastocitos, obtenidos por fertilización heteróloga.

Lugar.

El trabajo se realizó en el laboratorio de fertilización *in vitro* de la empresa “PREÑATEC S.R.L”, la misma se dedica al servicio de producción y transferencia de embriones vacunos obtenidos por la técnica de producción *in vitro* en la región norte del país, con la cual se celebró el respectivo acuerdo de trabajo con la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, siendo su socio gerente el M.V. Raúl Enzo Scarnatto. El laboratorio está ubicado en la ciudad de Corrientes capital, calle Lavalle 863.

Muestras.

Para cumplir con los objetivos del trabajo, los ovarios de hembras vacunas se obtuvieron del frigorífico “La Brava”, ubicado en la localidad de San Luis del Palmar, Corrientes. Se recolectaron 31 ovarios, los que fueron transportados al laboratorio de manera inmediata posterior a la faena en medio PBS (P-4417, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con gentamicina (50 mg/L), luego, en el lugar de trabajo estos fueron desprovistos de restos de tejidos y secados, para proceder a la aspiración de los folículos.

Para realizar la fertilización *in vitro* se trabajó con semen de un reproductor, descongelando dos dosis del mismo. Se utilizó semen de un reproductor búfalo, Elisir Pucará, un toro cruza carnicero con el que se llevó a cabo la fertilización heteróloga de ovocitos vacunos. El mismo se obtuvo de la Cabaña de Búfalos Pedro Antonio Silva (h), “Centro Integral de Inseminación Artificial Bubalina (CIIAB)”, único centro de inseminación de la especie habilitado en el país, ubicado en el departamento de General Paz, Provincia de Corrientes, con quien la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE cuenta con una carta acuerdo de trabajo. El centro cuenta con material seminal criopreservado de sus propios reproductores, de las razas Murrah y Mediterránea, de diferentes edades, y también con semen de reproductores importados.

Obtención de los complejos cúmulus ovocitarios (COCs).

La obtención de los complejos cúmulus ovocitarios (COCs) se realizó por el método de aspiración folicular, punzando los folículos visibles en la superficie de los ovarios mayores a 2 mm de diámetro, con ayuda de una aguja (40/12) unida a una línea de

aspiración folicular conectada a una bomba de vacío (WTA), la que trabajó a una presión de 75 mmHg. El licor folicular se recogió en tubos de 50 ml y se los mantuvo atemperados, se agruparon aproximadamente 2 o 3 ovarios por tubo, de acuerdo a la cantidad de folículos aspirados, y se enumeraron del 1 al 10. Posteriormente se dejaron decantar los COCs durante un lapso de 15 minutos y se procedió a la aspiración del sedimento con una pipeta de 1000 µl, luego se lo depositó en una placa de Petri para proceder a la búsqueda, con el agregado de 10 ml de PBS atemperado a 37°C.

El aislamiento de los COCs se realizó con una lupa estereoscópica a 40X, estos se clasificaron de acuerdo al método International Embryo Transfer Society (IETS Manual, IL) (Stringfellow y Seidel, 1998), teniendo en cuenta la cantidad de capas del cumulus presentes en: a) Grado 1- tres o más capas de cúmulos y citoplasma homogéneos, b) Grado 2- una a dos capas de cumulus presentes, c) Grado 3- corona radiada únicamente o citoplasma granuloso, picnótico o irregular, d) Grado 4- ovocito completamente desnudo.

En total se obtuvieron 242 COCs calidad I. Luego del aislamiento, se pasaron a otra placa donde se procedió a su lavado, para obtener una muestra lo más limpia posible, para ello se prepararon 3 gotas de 80 µl cada una con medio de lavado. Por último, los ovocitos fueron colocados en tubos con medio de maduración, los mismos se dividieron en 10 tubos con un promedio de 20-25 ovocitos cada uno.

Maduración de los ovocitos.

Luego del proceso de búsqueda y clasificación, los COCs se llevaron a estufa de maduración durante un lapso de 24 horas, en un ambiente con 5% CO₂ en aire humidificado (estufa Thermo SCIENTIFIC).

Fertilización *in vitro*.

Preparación del semen.

Las pajuelas se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante 1 minuto, una vez descongeladas se realizó la evaluación microscópica del semen para garantizar la calidad del mismo. Para ello se retiró la pajuela del baño de agua, se la secó y cortó en uno de sus extremos, obteniendo una muestra de 10 µl de esperma, esta microgota se depositó entre un porta y cubre objeto estériles y atemperados sobre platina térmica,

para la posterior observación al microscopio con un aumento de 100x. Se tuvieron en cuenta principalmente parámetros de viabilidad, motilidad en masa y motilidad individual o vigor, considerando como óptimo aquella muestra con una motilidad superior al 50% y un vigor mínimo de 3.

Capacitación espermática.

Los métodos de capacitación espermática empleados fueron a través de gradiente de Percoll (45%, 90%) y la técnica de lavado con medio de fertilización *in vitro* (Ocaña Quero *et al.*, 1997).

Método de gradiente de Percoll.

En este procedimiento para armar las columnas de Percoll, en un eppendorf se colocó 260 pl de Percoll 45% (130 pl de percoll 90% más 130 pl de medio TL) y luego, en la parte inferior se colocó 260 pl de Percoll 90%, evitando que se mezclen, la muestra de semen se colocó en la superficie y se lo llevó a centrifuga (mySPIN12 thermoscientific) a 6.600 rpm durante 5 minutos. Luego se pasó 40 pl del sedimento a un nuevo eppendorf que contenía 800 pl de medio FIV para someterlo nuevamente a centrifugación a 3.300 rpm por 5 minutos. Finalmente, con una pipeta automática se tomaron 45 pl del pellet de la porción inferior, listo para la fertilización *in vitro*.

Método de lavado.

Luego del descongelado y análisis de la pajuela, el semen se depositó en un eppendorf que contenía 800 pl de medio TL y se lo sometió a centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos, después se tomó 40 pl del sedimento y se lo pasó a un segundo tubo con 800 pl de medio FIV, para llevarlo nuevamente a centrifuga a 800 rpm por 5 minutos. Finalizado el proceso se tomaron 45 pl del sedimento y se colocó en un eppendorf para la posterior fertilización.

Preparación de los ovocitos.

Luego de 24 horas de maduración, y antes de la fertilización, se procedió al lavado de las estructuras, para ello se armaron 2 gotas de 70 pl con medio TL y 2 gotas de 70 pl con medio FIV, el mismo se llevó a cabo en placas de Petri, pasando sucesivamente de gota en gota. Este procedimiento se realizó con la finalidad de obtener estructuras libres de detritus que pudieran estar presentes, como así también para descartar aquellos

ovocitos que estén muy deteriorados después del periodo de maduración. Después del lavado los COCs fueron colocados en placas previamente estabilizadas en estufa durante una hora para realizar la fertilización, se trabajó con 2 placas, donde cada una contenía 5 gotas de 70 pl de medio FIV cubiertas con aceite mineral, en promedio se asignaron 20 a 24 ovocitos/gota. En una placa se colocaron las gotas pertenecientes a los tubos con numeración impar (1, 3, 5, 7, 9) y en otra la de los tubos con números pares (2, 4, 6, 8, 10).

FIV

Para la fertilización se colocó 5 pl de semen capacitado/gota, con una suspensión aproximada de 2×10^6 espermatozoides totales. El esperma se asignó de manera al azar según los distintos métodos de capacitación, el semen capacitado con gradiente de Percoll a las gotas impares (1, 3, 5, 7, 9) y el semen capacitado por medio de lavado a las gotas pares (2, 4, 6, 8, 10). Luego pasaron a incubación en estufa durante 20 horas, a una temperatura de $38,5^{\circ}\text{C}$ y una atmosfera de 5% CO_2 en aire humidificado (estufa Thermo SCIENTIFIC).

Cultivo *in vitro*.

Luego de 20 horas de coincubación de espermatozoides y ovocitos, las placas se retiraron de la estufa y se procedió al denudado mecánico de las estructuras por pipeteo, para liberar a los ovocitos de las células del cúmulus y los espermatozoides que hayan quedado adheridos a la zona pelúcida. Después se realizó un lavado de las estructuras por pasaje sucesivo en gotas de 70 pl, dos gotas con medio TL, una gota con un medio que contenía hialuronidasa intercalada entre las dos anteriores para favorecer el denudado, y dos gotas con el medio de cultivo SOF. Finalmente se realizó la siembra en placas de cultivo con el medio SOF en gotas de 100 pl, continuando con la misma organización que para la fertilización *in vitro*, dichas placas se estabilizaron durante una hora y media previo al procedimiento. Por último, pasaron a estufa en un ambiente controlado con 5% CO_2 , 5% O_2 y 90% N_2 (estufa Thermo SCIENTIFIC).

Permanecieron en cultivo durante 8 días; el día 3 (D3) de cultivo se realizó un recambio de medio, eliminando 50 pl del medio SOF y agregando la misma cantidad para mantener los 100 pl de la gota de cultivo, como así también la eliminación de aquellas estructuras que no continuaron en división. Se evaluó el clivaje y se observaron 159

estructuras en división, representando un 66% del total de ovocitos obtenidos (242). Se realizó el mismo trabajo el día 5 (D5), contando 62 estructuras (39% sobre el D3). Antes de la vitrificación, en el día 6 (D6) se contabilizaron 57 estructuras en división (92% sobre el D5). El día 7 (D7) se evaluaron los embriones y los blastocistos de calidad I fueron vitrificados, continuando el resto de las estructuras en cultivo por un día más.

Vitrificación de embriones.

El día 7, previo a la vitrificación se realizó una clasificación y selección de embriones, considerando parámetros como la forma, simetría de los blastómeros, tonalidad, estructuras visibles, integridad de la zona pelúcida, etc. Solo se vitrificaron embriones de calidad excelente, descartando los de calidad regular y mala. Los embriones pasaron de las gotas en las que se encontraban en el medio de cultivo a placas que contenían los medios de vitrificación (VO, VI y V2), cada pocilio de estas placas contenía 800 pl del medio; luego de la descarga de los embriones en el medio VO, pasaron al VI donde permanecieron durante un minuto, por último pasaron a una microgota final con el V2 por menos de 35 segundos hasta ser cargados en un soporte artesanal consistente en una pajuela amarilla de 0,25 cc estirada por calor y la punta cortada en pico de flauta, lugar este, donde se depositan los embriones y se extrae el medio excedente. Todo este procedimiento se realizó en condiciones estériles a temperatura ambiente, para finalmente ser colocados en nitrógeno líquido (-196°C) donde van a permanecer por tiempo indefinido. Fueron cargados hasta 5 embriones por soporte.

Análisis estadístico

El análisis comparativo de las variables evaluadas, métodos de capacitación espermática y cultivo de embriones, se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Este modelo se analizó con el test de Tukey para poder comparar las medias de los tratamientos de esta investigación. Para el análisis de datos se utilizó el software InfoStat-Statistical (Di Renzo y col., 2020).

Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Evolución de las estructuras hasta el estadio de blastocisto en las distintas etapas de cultivo según método de separación y capacitación espermática utilizado.

MÉTODO	OVULOS N	CIV n (%)	D3 n (%)	D5 n (%)	D7 n (%)	D7 + D8 n (%)
PERCOLL	101	90 (89)	60 (59)	27 (27)	11(11)	20 (20)
LAVADO	141	129 (91)	99 (70)	35 (25)	22 (16)	33 (23)
TOTALES	242	219 (90)	159 (66)	62 (26)	33 (14)	53 (22)

NOTA: en los días 7 y 8 no se consideraron las mórulas.

Del total de 242 COCs de calidad I sometidos al proceso de fertilización *in vi tro*, 101 ovocitos fueron fertilizados con semen capacitado por el método de Percoll y 141 con semen capacitado por la técnica de lavado, contándose al momento del cultivo un total de 219 estructuras (90%).

La tasa total de clivaje obtenida en el D3 fue de 66% (n= 159), siendo del 59% para el método de Percoll y 70% con el método de lavado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$). En el D5 las estructuras que continuaron su desarrollo fueron de 26% (n= 62), con porcentajes muy similares entre ambos métodos (25% y 27% para lavado y Percoll, respectivamente, $p>0,05$).

En total, en el presente trabajo se produjeron 53 embriones híbridos, lo que representa un 22% del total de estructuras (considerando embriones D7 + D8). No se observaron diferencias significativas entre métodos de capacitación espermática ($p>0,05$). De estos, 33 se obtuvieron de ovocitos fecundados con semen capacitado por medio de lavado (23%) y 20 por el método de gradiente de Percoll (20%). Del total de embriones, solo los de calidad excelente se vitrificaron el día 7, con una tasa de desarrollo de blastocitos del 14% (n= 33), de los cuales, 22 fueron capacitados por medio de lavado (16%) y 11 por gradiente de Percoll (11%).

DISCUSIÓN

Avery y Greve en 1995, realizaron fertilización homologa de ovocitos vacunos obtenidos de ovarios de matadero con semen de toro raza Jersey, comparando dos métodos de capacitación espermática: gradiente de densidad de Percoll y lavado, y obtuvieron mejores resultados trabajando con el método de lavado. Determinaron la tasa de clivaje 48 horas post fertilización, porcentaje de blastocistos el día 7 y porcentaje de blastocistos eclosionados el día 9, diferenciando los resultados según proceso de capacitación del semen. Los resultados obtenidos de 3 repeticiones mostraron tasas de escisión del 33% y de blastocistos del 4% para el semen capacitado por el método de gradiente de Percoll, en cambio, con semen capacitado por medio de lavado convencional obtuvieron un 73% de escisión y 26% de blastocistos. Estos concluyen, que algunos lotes de Percoll son perjudiciales para los espermatozoides, y que este hecho puede no ser fácilmente perceptible, ya que la motilidad de los espermatozoides no está necesariamente disminuida.

Bastidas *et al.* en 1997, con el objetivo de evaluar fertilización homologa y heteróloga, trabajaron con ovocitos de vacas y búfalas, y semen congelado de toros *Bos taurus*, *Bos indicus* y *Bubalus bubalis* capacitados con heparina (10mg/mL), reportaron una tasa de fertilización heteróloga (ovocitos de vaca y semen de búfalo) del 65%, similar a lo obtenido en nuestro estudio.

Scamatto *et al.* 2022, evaluaron la factibilidad de fertilizar óvulos vacunos con semen de búfalo y así poder desarrollar futuras investigaciones sobre el semen. El proceso de producción de embriones fue similar, con la salvedad que el semen usado en este caso solo fue capacitado por el método de lavado con medio FIV, obteniendo una tasa de clivaje y producción de blastocistos de D3 (24%), D5 (9%) y D7 (2%), siendo estos resultados inferiores a los obtenidos en el presente trabajo.

Ocaña Quero *et al.* 1997, realizando fertilización homologa entre ovocitos y semen vacuno congelado de raza Limusin, compararon dos métodos de capacitación del semen, obteniendo índices de fecundación *in vitro* significativamente más altos ($p < 0,01$) con la técnica de gradiente de densidad de Percoll (61,7%), en comparación con el método de lavado convencional (40,2%); siendo también muy superior estadísticamente ($p < 0,01$) la tasa de clivaje obtenida de los ovocitos fecundados con el semen capacitado por gradiente de densidad de Percoll (65%), en comparación al método de lavado (44,8%). Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestro trabajo;

concluyen que el método del gradiente de Percoll permite incrementar el índice de recogida de espermatozoides vivos con morfología normal y acrosomas íntegros por muestra, lo que favorece la posibilidad de aumentar el número de ovocitos fecundados y por lo tanto, obtener un mayor número de embriones.

Tatham en el 2000, trabajando con gradiente de densidad de Percoll, comparó diferentes concentraciones de espermatozoides y niveles de heparina y cafeína, y evaluó el desarrollo de embriones híbridos, utilizando espermatozoides de búfalo obtuvo 61% de fertilización, 21,9% de escisión y 7,3% de blastocistos, resultados inferiores a los obtenidos en nuestro estudio. Tatham concluye que no hubo diferencia en la capacidad de los espermatozoides de búfalo o vacuno en la fertilización y que es probable que los ovocitos de búfala representen el mayor desafío para el éxito de la FIV en búfalos.

Estudios de Kochhar *et al.* 2002, en un intento de producir embriones híbridos de ganado doméstico (*Bos taurus*) y búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), realizó fertilización heteróloga entre ovocitos de vacuno y espermatozoides de búfalo, y ovocitos de búfalo con espermatozoides de toro, comparando la tasa de escisión y las características posteriores a la fecundación de embriones híbridos hasta el estadio de blastocisto. Ovocitos de búfalo expuestos a espermatozoides de búfalo (BxB) resultó en una tasa de escisión significativamente mayor (58,2%), en comparación con ovocitos de búfala expuestos a semen vacuno (40,8%). Embriones cultivados hasta 8 días después de la inseminación, para determinar la tasa de blastocistos, revelaron que una proporción significativamente mayor ($p < 0,05$) de embriones BxB (29,6%) alcanzó la etapa de blastocisto mientras que entre los híbridos búfala por vacuno sólo el 8,8% llegó a esta etapa. La tasa de división para el grupo híbrido de ovocitos vacunos con semen de búfalo fue del 86,3%, de los cuales el 25,94% evolucionaron hasta el estadio de blastocisto. Comparando la tasa de división y producción de blastocistos, nuestros resultados fueron inferiores a los reportados en este trabajo.

Patil y Totey en 2003, cruzaron ovocitos de búfala con espermatozoides de búfalo (homólogo) y vacuno (heterólogo) capacitados por medio de gradiente de Percoll. La tasa general de fertilización fue similar, 78,4% con espermatozoides de vacuno y 80,2% con espermatozoides de búfalo. La tasa de escisión inicial entre el búfalo y el embrión híbrido también fue similar, y no hubo una diferencia significativa en su tasa de desarrollo hasta la etapa de 8 células ($26 \pm 4,1$ vs. $24,3 \pm 4,8$). Sin embargo, la tasa de desarrollo de embriones híbridos en mórula y blastocisto fue 5,7 y 5,3%,

respectivamente, en comparación con embriones búfalo-búfalo, donde la tasa de formación de mórula y blastocisto fue de 24,5 y 21,7%. Aquí se demostró que es posible producir embriones híbridos por fecundación *in vitro* de ovocitos de búfalo maduros con espermatozoides vacunos.

Owiny *et al.* en el 2009, en un estudio de FIV utilizando ovocitos vacunos por semen de búfalo africano (heterólogo) y semen vacuno (homólogo), obtuvo un 67,2% de escisión en los ovocitos inseminados con el espermatozoide de vacuno. Por el contrario, la fertilización con espermatozoide de búfalo resultó en una tasa de escisión de solo 4,6%. De los embriones homólogos divididos, el 52,2 % progresó hasta la etapa de mórula en comparación con el 12,7 % de los embriones híbridos. No se desarrollaron embriones híbridos más allá de la etapa temprana de mórula, mientras que el 40,1% de los embriones de ganado se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto. La tasa de división y la tasa de desarrollo de mórula de los embriones de ganado derivados de FIV fueron mayores que las de los embriones híbridos de búfalo por vacuno.

CONCLUSIONES

En general, en el presente trabajo se obtuvieron una buena tasa de clivaje y aceptable tasa de blastocistos. No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de capacitación espermática. Por lo tanto, es factible usar cualquiera de los dos métodos de separación y capacitación espermática para lograr que el semen de búfalo fertilice.

En el presente trabajo se utilizó un solo búfalo, sin embargo, esto sienta las bases para la siguiente etapa de comparación de distintos reproductores y correlación con la fertilidad a campo y producción *in vitro* de embriones, a fin de estandarizar un test de fertilidad seminal del búfalo basada en la fertilización *in vitro* de ovocitos heterólogos, para poder establecer un ranking de acuerdo a los resultados, y de ser posible evaluar la fertilidad de los mismos confrontándolos con ovocitos de búfalas, pese a la dificultad de obtener ovarios de mataderos de estas hembras, siendo una importante limitante.

Teniendo en cuenta que en la Argentina y en particular en la región del NEA, el búfalo es una especie que está siendo cada vez más investigada y tanto la producción, como la implementación de biotecnologías en la misma es cada vez mayor, hay que seguir recabando datos para ampliar la información referida al tema y otros en relación a la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Allende, R; Arisnabarreta, E. 2021. Fisiología espermática, producción de semen y evaluación de la calidad seminal, p: 1-62: http://cmvsf2.org/web/wp-content/uploads/2021/03/Fisiolog%C3%ADa-esperm%C3%A1tica_Allende-y-Arisnabarreta_2020_compressed.pdf
- Avery, B; Greve, T. 1995. Impact of percoll[®] on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*. 44, 871-878.
- Baruselli, P.S; Soares, J.G; Bayeux, B.M; Silva, J.C.B; Mingoti, R.D; Carvalho, N.A.T; 2018. Tecnologías de reproducción asistida (ART) en búfalos de agua. *Anim. Reprod.* 15, 971-983.
- Bastidas, P; Fernández, A; Trocóniz, J. 1997. Fertilización in vitro heteróloga en búfalos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5, 415-416.
- Cesari, A; Kaiser, G.G; Mucci, N; Mutto, A; Vincenti, A; Fornés, M.W; Alberio, R.H; 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*. 66, 1185-1193.
- Crudeli, G.A; Konrad, J.L; Garrido, M; Maldonado Vargas, P; Patiño, E.M. 2016. Buffalo population growth in Argentina. *The 11th World Buffalo Congress. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. P: 177.
- Crudeli, G.A; Patiño, E.M; Maldonado Vargas, P; Konrad, J.L. 2021. Los búfalos en Argentina. *Rev vet.* 32, 169-173.
- Currin, L; Baldassarre, H; Priotto De Macedo, M; Giehl Glanzner, W; Gutiérrez, K; Lazaris, K; Guay, V; Carrillo Herrera, M E; Da Silva, Z; Brown, C; Joron, E; Herrón, R; Bordignon, V. 2022. Factors Affecting the Efficiency of In Vitro Embryo Production in Prepubertal Mediterranean Water Buffalo. *Animáis*. 1-18.
- De Camargo, G.M.F; Aspilcueta-Borquis, R.R; Fortes, M.R.S; Porto-Neto, R; Cardoso, D.F; Santos, D.J.A; Lehnert, S.A; Reverter, A; Moore, S.S; Tonhati, H. 2015. Prospecting major genes in dairy buffaloes. *BMC Genomics*. 16, 1-14.
- De Carvalho, J.G.S; De Carvalho, N.A.T; Bayeux, B.M; Watanabe, Y.F; Watanabe, O.Y; Mingoti, R.D; Baruselli, P.S. 2019. Superstimulation prior to the ovum pick-up

- improves the in vitro embryo production in nulliparous, primiparous and multiparous buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*. 138, 164-168.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Galli, C; Duchi, R; Crotti, G; Turini, P; Ponderato, N; Colleoni, S; Lagutina, I; Lazzari, G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59, 599-616.
- Gasparrini, B. 2002. In vitro embryo production in buffalo species: State of the art. *Theriogenology* 57, 237-256.
- Gillan, L; Evans, G; Maxwell, W.M.C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 63, 445-457.
- Hillery, F.L; Parrish, J.J; First, N.L. 1990. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology*. 33: 249.
- Husna, A.U; Azam, A; Qadeer, S; Awan, M.A; Nasreen, S; Shahzad, Q; Fouladi-Nashta, A; Khalid, M; Akhter, S. 2017. Sperm preparation through Sephadex™ filtration improves in vitro fertilization rate of buffalo oocytes. *Reprod Dom Anim*. 53, 377-384.
- Kale, D.S; Yadav, B.R; Prasad, J. 2014. DNA polymorphisms at candidate gene loci and their relation with milk production traits in Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 4, 39-43.
- Kochhar, H.P.S; Appa Rao, K.B.C; Luciano, A.M; Totey, S.M; Gandolfi, F; Basrur P.K; King, W.A. 2002. In vitro production of cattle-water buffalo (*Bos taurus* - *Bubalus bubalis*) hybrid embryos. 10, 155-162
- Kroestch, T.G; Stubbings, R.B. 1992. Sire and insemination dose does effect in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 37, 240.
- Lonergan, P. 1994. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. *Reprod. Dom. Anim*. 9, 489-496.

- Marquant-Le Guienne, B; Humblot, P; Thibier, M; Thibault, C. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 259-266.
- Mehmood, A; Anwar, M; Saqlan Naqvi, S.M. 2009. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 111, 141-148.
- Nasr, M; Awad, A; El Araby, I. 2016. Associations of leptin and pituitary-specific transcription factor genes polymorphisms with reproduction and production traits in dairy buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*. 51, 597-603.
- Ocaña Quero, J.M; Moreno Millán, M; Pinedo Merlín, M; Ortega Mariscal, M.A; Rodero Franganillo, A. 1997. Efecto del método de selección de esperma congelado de bovino sobre los índices de fecundación y división in vitro. *Arch. Zootec.* 46, 153-158.
- Owiny, O.D; Barry, D.M; Agaba, M; Godke, R.A. 2009. In vitro production of cattle buffalo hybrid embryos using cattle oocytes and African buffalo (*Syncerus caffer caffer*) epididymal sperm. *Theriogenology*. 71, 884-894.
- Parrish, J.J; Krogenaes, A; Susko-Parrish, J.L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 44, 859 - 869.
- Patil, S; Totey, S. 2003. Developmental Failure of Hybrid Embryos Generated by In Vitro Fertilization of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocyte with Bovine Spermatozoa. *Molecular reproduction and development*. 64, 360-368.
- Peláez Peláez, V. A. 2011. Producción in vitro de embriones bovinos. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mvl70.pdf>
- Petrovas, G; Kosior, M.A; Presicce, G.A; Russo, M; Zullo, G; Albero, G; Alkan, S; Gasparini, B. 2020. FSH stimulation with short withdrawal improves oocyte competence in Italian mediterranean buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Animais*. 10, 1-11.

- Saeki, K; Nagao, Y; Hoshi, M; Nagai, M. 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free médium. *Theriogenology*. 43, 751-759.
- Sakaguchi, K; Maylem, E.R.S; Tilwani, R.C; Yanagawa, Y; Katagiri, S; Atabay, E.C; Atabay, E.P; Nagano, M. 2019. Effects of follicle-stimulating hormone followed by gonadotropin-releasing hormone on embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in the river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Sci. J.* 90, 690-695.
- Salgado, R.D; Rugeles, C.C; Alvarez, J. 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18 (2), 122-126.
- Salzano, A; De Canditiis, C; Della Ragione, F; Prandi, A; Zullo, G; Neglia, G; Campanile, G; Gasparrini, B. 2018. Evaluad on of factors involved in the failure of ovum capture in superovulated buffaloes. *Theriogenology*. 122, 102-108.
- Sansíñena, M; Gasparrini, B. 2016. Producción in vitro de embriones en el búfalo [en línea]. En: *Reproducción en búfalas / Crudeli, Gustavo; Konrad, José Luis; Patiño, Exequiel María*. Buenos Aires: Moglia Ediciones. ISBN 978-987-619-264-4.
- Scamatto, R.E; Konrad, J.L; Bentivoglio, A.B; Bando, A; Vallejos, N; Maldonado Vargas, P. 2022. Fertilización heteróloga de óvulos bovinos con semen de búfalo. *Simposio internacional de reproducción animal - IRAC*. p: 350: <https://iracbiogen.com/libro-14-simposio/>
- Shamsuddin, M; Niwa, K; Larsson, B; Rodríguez Martínez, H. 1996. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 613-622.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). 2013. 2020. <http://www.senasa.gov.ar>.
- Stringfellow, D.A; Seidel, S.M. 1998. *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary precautions*, 3rd ed., Ed. Savoy, Illinois (USA).

- Tantia, M.S; Galvao, S.R; Caetano, A.R; Paola, M; Mizziara, M.N; Aravind, K.M; Bobby, M; Pardha, S.G; Satish, K; Apama, P. 2008. A first-generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. *BMC Genomics*. 9, 631.
- Tatham B. 2000. Increasing buffalo production using reproductive technology: A report for the rural industries research and development Corporation. Victorian Institute of Animal Science, p 1-32.
- Ward, F; Enright, B; Rizos, D; Boland, M.P; Lonergan, P. 2002. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 57, 2105-2117.
- Ward, F; Rizos, D; Boland, M.P; Lonergan, P. 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*. 59, 1575-1584.
- Wilmut, I; Young, L; De Sousa, P; King, T. 2000. New opportunities in animal breeding and production - an introductory remark. *Animal Reproduction Science*. 60-61, 5-14.
- Zhang, B.R; Larsson, B; Lundeheim, N; Rodríguez Martínez, H. 1997. Relationship between embryo development in vitro and 56 day nonreturn rates of cows inseminated with frozenthawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*. 48, 221-231.
- Zicarelli, L. 2004. Buffalo milk: its properties, dairy yield and mozzarella production. *Veterinary Research Communications*. 28, 127-135.