

Producción de embriones de búfalo por fertilización *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado

Konrad, J.L.^{1,3}; Scian, R.²; Garrido, M.J.¹; Taminelli, G.²; Sansinena, M.^{2,3}

¹Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel/Fax 0379-4425723. ²Lab. Reprod. Anim. Fac. Cs. Agr., Univ. Católica Arg. ³CONICET. E-mail: konradjl@hotmail.com.

Resumen

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. Rev. vet. 24: 2, 97-101, 2013. El búfalo (*Bubalus bubalis*) es una especie con excelente adaptación a sectores inundables. El mejoramiento genético a través de superovulación y transferencia embrionaria ha tenido escasos resultados debido a dificultades en la detección de celo, pobre respuesta ovárica y limitada recuperación de embriones post-lavaje. La técnica de fertilización *in vitro* de embriones (FIV) es una biotecnología de gran impacto en el progreso genético. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los eventos tempranos de la FIV, analizando la tasa de maduración y desarrollo embrionario post-fertilización de ovocitos madurados *in vitro* (IVM) durante el transporte. Ovocitos bovinos y bubalinos fueron obtenidos por punción folicular de ovarios *post-mortem* e IVM durante el transporte por un período de 18 h. Se realizó la FIV con toros de fertilidad comprobada, con una concentración en microgotas de inseminación de 3-4 x 10⁶ espermatozoides motiles/ml por un período de 6 horas. Los embriones fueron cultivados en medio oviductal sintético SOFaa en incubadora gaseada y ambiente humidificado a 38,5°C durante 9 días. Se evaluaron las tasas de IVM, clivaje (día 2 post-fertilización) y blastocisto (días 7 a 9). Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando Fischer's Exact Test (p<0,05). No se observaron diferencias significativas en la tasa de maduración de ovocitos bubalinos de buena calidad respecto al control sin transporte (72 vs 88%), pero se registró una reducción significativa en la maduración de los ovocitos bubalinos de mala calidad (35%). Asimismo, se lograron producir los primeros embriones bubalinos luego de FIV, aunque las tasas de clivaje (34 vs 70 y 78%) y blastocisto (3 vs 27 y 31%) fueron significativamente menores en búfalos que en bovinos con y sin transporte, respectivamente. Los datos del presente trabajo constituirían el primer informe de FIV en búfalos y producción *in vitro* de embriones luego de IVM de ovocitos durante el transporte.

Palabras clave: búfalo, embriones, fertilización *in vitro*, transporte.

Abstract

Konrad, J.L.; Scian, R.; Garrido, M.J.; Taminelli, G.; Sansinena, M.: Buffalo embryos produced by *in vitro* fertilization from oocytes matured during long-term transport. Rev. vet. 24: 2, 97-101, 2013. The water buffalo (*Bubalus bubalis*) is a species with excellent adaptation to flood-prone environments. Genetic improvement using the multiple ovulation and embryo transfer approach has been met with poor results in the buffalo, mainly due to difficulties in heat detection, erratic ovarian response to treatments and low embryo recovery post-flush. *In vitro* fertilization (IVF) is a powerful reproductive biotechnology that may provide a tool for genetic improvement in this species. The objective of this experiment was to study early embryonic events after IVF in the buffalo, analyzing *in vitro* maturation and IVF of oocytes matured during ground transportation. Bovine and bubaline oocytes were collected by follicular aspiration of post-mortem ovaries and *in vitro* matured for 18 h during ground transportation. *In vitro* fertilization was conducted, semen from bulls of proven fertility was processed and adjusted to a final concentration of 3-4 x 10⁶ motile spermatozoa/ml in the insemination drops, oocytes were co-incubated for a period of 6 h. Embryos were then cultured in synthetic oviductal fluid (SOFaa) medium in an incubator and humidified atmosphere at 38.5°C for 9 days. Oocyte maturation, cleavage and blastocyst rates were evaluated on days 0, 2 and 7 to 9, respectively and results were statistically analyzed using

Fischer's Exact Test ($p < 0.05$). No significant difference was observed in the maturation rate of bubaline oocytes of good quality vs the non-transported control (72 vs 88%); however, the maturation rate of bubaline oocytes of bad quality was significantly lower (35%) than the rest of the groups. Data of present experiment are the first report of buffalo embryos produced by IVF from oocytes matured during transportation, although the cleavage (34 vs 70 and 78%) and blastocyst (3 vs 27 and 31%) rates were significantly lower for the buffalo than for the transported and non-transported domestic cattle, respectively.

Key words: buffalo, embryos, *in vitro* fertilization, transport.

INTRODUCCIÓN

El búfalo doméstico, una especie introducida desde continente asiático, es tradicionalmente agrupado dentro de la sub-familia *Bovidae*, género *Bubalus*, especie *bubalis*. Argentina cuenta en la actualidad con la cuarta población bubalina del continente, aproximadamente 100.000 animales¹¹ y produce tres de las razas de mayor importancia económica en el mundo: Mediterránea, Murrah y Jafarabadi.

Nuestro país posee varias regiones sub-explotadas desde el punto de vista ganadero debido a la falta de adaptación del ganado vacuno a sectores bajos e inundables. Por su gran capacidad de conversión de pastos naturales en carne y por la perfecta coincidencia de las curvas de requerimiento con las curvas de oferta forrajera del subtrópico húmedo, el búfalo representa una herramienta valiosa para la presente y futura expansión ganadera de zonas marginales como el litoral del país y la cuenca del río Salado.

El mejoramiento genético en búfalos mediante la transferencia de embriones *in vivo* ha tenido escaso éxito, principalmente debido a las dificultades en la detección de celo³, pobre respuesta ovárica y limitada recuperación de embriones post-lavaje. Por la maximización en la eficiencia de la utilización del germoplasma y su efecto sobre el intervalo generacional, la producción de embriones por fertilización *in vitro* (FIV) es una herramienta productiva de gran impacto en el progreso genético¹⁵.

Una de las mayores limitantes en la implementación de la FIV en cualquier especie es el transporte de la célula reproductiva de la hembra, el ovocito, hasta instalaciones con equipamiento y técnicos capacitados para la realización de la fertilización *in vitro*. Adicionalmente, la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones transferibles requiere que, para especies nuevas o no tradicionales, sea necesario el desarrollo de la metodología y evaluación de protocolos de fertilización *in vitro* con material derivado de frigorífico (ovocitos de genética y origen desconocido) previo a su implementación comercial.

El objetivo del trabajo fue estudiar los eventos tempranos de la fertilización *in vitro* en el búfalo, en particular la tasa de maduración *in vitro* (IVM) y la viabilidad de ovocitos bubalinos madurados *in vitro* durante

el transporte terrestre durante 18 horas, así como su potencial de desarrollo luego de la fertilización *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron recuperados ovocitos de búfalas y vacas por punción folicular de ovarios *post-mortem* (frigorífico). Los ovarios fueron transportados inmediatamente al laboratorio en PBS (P-4417, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con gentamicina (50 mg/L) a 30°C en contenedores isotérmicos. Una vez en el laboratorio (<1 hora de tránsito), los ovarios fueron lavados en PBS + gentamicina y los complejos cumulus-ovocito (COCs) fueron recuperados por punción folicular.

Los folículos visibles en la superficie del ovario fueron aspirados con jeringa de 5 ml con aguja 21 g. El aislamiento de los COCs fue realizado bajo lupa estereoscópica a 40X. Una vez aislados los ovocitos fueron clasificados por calidad de acuerdo a la categorización IETS (International Embryo Transfer Society) en grado 1 (excelentes, 3 o más capas de cumulus compacto), grado 2 (buenos, 2-3 capas de cumulus), grado 3 (regulares, corona radiata únicamente) o grado 4 (malos, desnudados, picnóticos o atrésicos).

Una vez clasificados, los ovocitos fueron lavados y colocados en tubos Eppendorf con medio de transporte para maduración *in vitro* consistente de TCM-199 (Invitrogen 11150-059), 5 ug/ml pFSH (Follitropin, Bioniche), 50 g/mL de gentamicina (Sigma), 25 mM hepes (Sigma) y 10% suero fetal bovino (Gibco), siendo trasladados por vía terrestre en una transportadora de embriones (Minitube, Alemania) de temperatura controlada (37°C) durante 18 horas.

Una vez recibidos, los ovocitos fueron evaluados en base a presencia y grado de expansión de las células del cumulus y se procedió al pelado mecánico del cumulus por pipeteado (pipeta de Pasteur de borosilicato estirada), en TCM suplementado con 1 mg/ml de hialuronidasa (Sigma).

El estado de maduración fue evaluado por la presencia del primer cuerpo polar a las 18 horas de IVM. Adicionalmente, algunos ovocitos fueron aleatoriamente seleccionados para evaluación de maduración nuclear y configuración de cromatina, por tinción con bisbenzimidida (Hoechst 33342) y visualización en microscopio invertido Nikon Ti-Ucon óptica Hoffman

(40X) y fluorescencia (filtro UV). La visualización y rotación de ovocitos fue asistida por micromanipuladores y microinyectores Narishige.

El estado de maduración nuclear y configuración de cromatina de los ovocitos teñidos fue clasificado en GV (vesícula germinal), GVBD (vesícula germinal en transición), MI (metafase I) y MII (metafase II). El resto de los ovocitos fue sometido a protocolo de fertilización *in vitro* de acuerdo con el método publicado por Brackett y Oliphant ², con modificaciones. El semen de un toro bubalino de fertilidad comprobada y buenos parámetros andrológicos post-descongelación fue colocado a 37°C durante 1 minuto en baño de agua, diluido en medio de fertilización con heparina y cafeína; la fracción rica en espermatozoides con motilidad individual progresiva fue aislada a través de método *swim-up*.

Los espermatozoides fueron lavados 2 veces por centrifugación (6 min a 200 rpm) en medio Brackett-Oliphant (BO) ² suplementado con 7,75 mM de lactato de calcio y 20% de suero fetal bovino. El pellet fue resuspendido en medio BO e incubado a 38°C y 5% CO₂ en aire durante 1 hora. Los ovocitos fueron lavados en medio BO-3% BSA y coincubados en microgotas de suspensión de espermatozoides (concentración 3-4 x 10⁶ espermatozoides/ml) durante un periodo de 6 horas (15 ovocitos/gota de 70 µl).

Luego del periodo de coincubación, los ovocitos fueron lavados dos veces en medio de cultivo embrionario SOFaa y cultivados en incubadora con 5% CO₂ en aire de ambiente humidificado a 38,5°C durante 9 días. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando Fischer's Exact Test, con un valor α del 5%.

Tabla 1. Morfología y maduración nuclear de ovocitos de búfala y vaca luego de 18 horas de maduración *in vitro* (IVM) durante el transporte.

tratamiento	n	LI	SL	CC	M/SL	T			
						GV	GVBD	MI	MI
vaca control (sin transporte)	49	0	49	49	43 (88)	6	0	0	43
vaca (grado 1-2)	50	0	50	50	43 (86)	6	1	0	43
vaca (grado 3-4)	52	9	43	33	27 (63)	8	3	5	27
búfala (grado 1-2)	18	3	15	15	11 (72)	3	1	0	11
búfala (grado 3-4)	21	10	11	5	4 (35)*	4	1	2	4

n: cantidad, LI: lisados, SL: sin lisar, CC: con cumulus, M/SL: número de ovocitos maduros/número de ovocitos sin lisar, con oolema intacto, T: tinción bisbenzimid (Hoechst 33342, 5 µg/ml) y evaluación por fluorescencia (UV), GV (vesícula germinal), GVBD (vesícula germinal en transición), MI (metafase I) y MII (metafase II).

*diferencia significativa entre valores de una misma columna ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de la maduración *in vitro* durante el transporte y la calidad respecto a la presencia de cumulus expandido y su tasa de maduración nuclear se presentan en la Tabla 1 y las Figuras 1 y 2. Si bien el número de réplicas (2) del estudio fue limitado, los resultados de maduración *in vitro* del control (vaca), indican que fue viable realizar la maduración *in vitro* durante el transporte sin afectar significativamente la calidad y la maduración nuclear de los ovocitos de ambas especies. Además, los resultados indican una alta proporción de lisado y una significativa disminución de la viabilidad y maduración nuclear del ovocito bubalino de menor calidad (grados 3 y 4).

Los resultados preliminares de fertilización *in vitro* en el búfalo se presentan en la Tabla 2 y Figura 3.

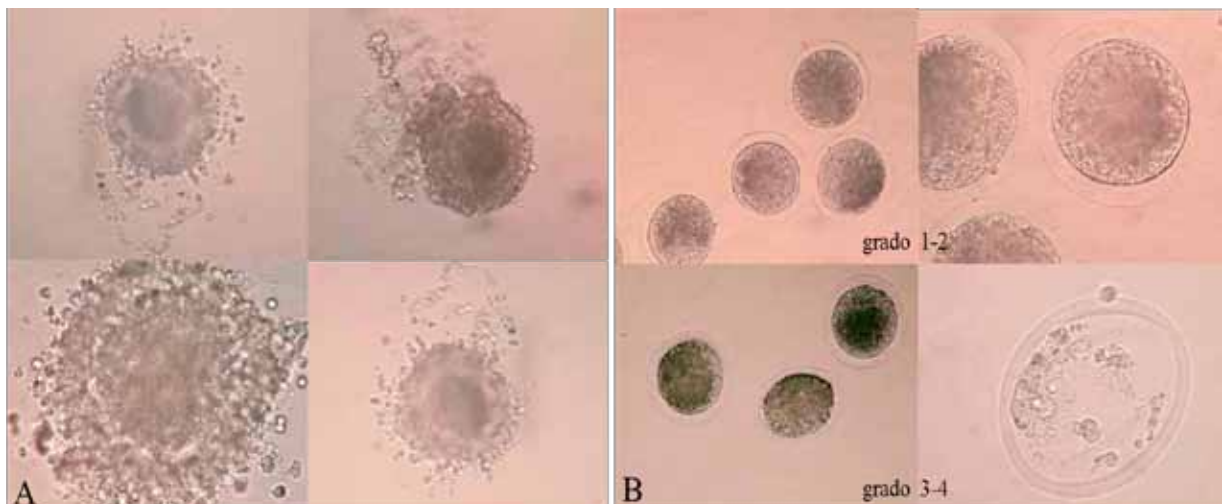


Figura 1. A: Ovocitos de búfala con cumulus luego de 18 horas en IVM. B: Ovocitos de búfala sin cumulus luego de 18 horas en IVM, grados 1-2 y 3-4.

No se observaron efectos significativos de la maduración *in vitro* durante el transporte de los ovocitos bovinos ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Una de las mayores limitantes en la implementación de la fertilización *in vitro* en cualquier especie es el transporte de la célula reproductiva de la hembra u ovocito hasta instalaciones con equipamiento y técnicos capacitados para la realización de la fertilización *in vitro*. A diferencia de los programas de transferencia embrionaria, que pueden ser implementados con éxito dentro del mismo establecimiento, la fertilización *in vitro* requiere de técnicos capacitados y equipamiento de mayor complejidad. Ello determina que la fertilización *in vitro* deba realizarse en labora-

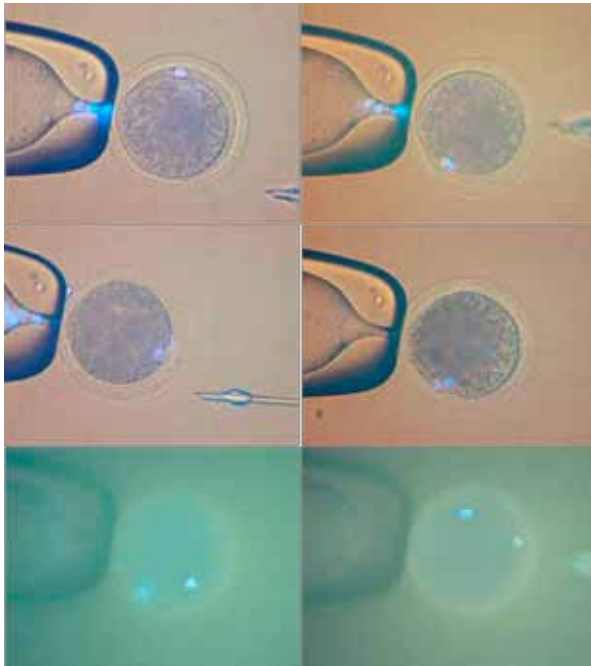


Figura 2. Ovocitos de búfala maduros (Metafase II), tinción con Hoechst 33342 luego de 18 horas de maduración *in vitro*.



Figura 3. Embriones de búfala producidos por fertilización *in vitro* luego de la maduración de ovocitos durante el transporte de 18 horas.

Tabla 2. Resultados preliminares de fertilización *in vitro* y producción *in vitro* de embriones bovinos y bubalinos luego de la maduración *in vitro* del ovocito durante el transporte de 18 horas.

tratamiento	n	día 2		días 7-9	
		N° (%) clivados	N° (%) 8-16 células	N° (%) mórula	N° (%) blastocisto
vaca control (sin transporte)	45	35 (78)	12 (27)	2 (4)	14 (31)
vaca (transporte 18 h)	50	35 (70)	11 (22)	4 (8)	13 (27)
búfala (transporte 18 h)	29	10 (34)*	6 (20)	3 (10)	1 (3)*

día: días en cultivo *in vitro*. *Diferencia significativa entre valores de una misma columna, ($p < 0,05$).

torios especializados, frecuentemente distantes de los establecimientos donde se encuentran las donantes.

La maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros (vesícula germinal) durante el transporte ha sido ampliamente estudiada en el bovino doméstico^{1,10}. Varios reportes dan cuenta 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 y la susceptibilidad de los mismos a la criopreservación¹².

Si bien existen relaciones entre las condiciones de cultivo *in vitro* y la calidad y cantidad de embriones logrados, hay un marcado efecto del origen y calidad del ovocito¹³. Otros investigadores reportaron que los ovocitos madurados *in vivo* (maduración intrafolicular) poseen significativamente mayores probabilidades de alcanzar el estadio de blastocisto post-fertilización *in vitro* que aquellos embriones derivados de ovocitos madurados *in vitro*^{6-8,14}.

Los resultados del presente estudio indican que es posible realizar la maduración *in vitro* del ovocito bubalino durante el transporte terrestre sin comprometer la dinámica de maduración nuclear ni la proporción de ovocitos que alcanzan el estadio de metafase-II (preovulatorio).

Es interesante destacar que la calidad inicial del ovocito bubalino (grados 1-2 vs grados 3-4) tuvo un efecto significativo sobre la proporción de ovocitos madurados, a diferencia del bovino, en el cual se observó una tendencia a la disminución de tasa de maduración nuclear, la cual no alcanzó niveles significativos. Estos resultados preliminares indicarían una mayor susceptibilidad del ovocito bubalino durante la maduración *in vitro*, razón por la cual podría ser necesario ser más estricto en la selección de la calidad de los ovocitos para su maduración y fertilización *in vitro*.

Diversos autores han reportado un desarrollo embrionario más veloz en la especie bubalina comparado con el del bovino doméstico. Se ha observado que la zona pelúcida desaparece luego de la eclosión

del embrión, dificultando la recuperación de embriones luego del lavaje uterino dado que el blastocele se encuentra frecuentemente colapsado^{4,5}. Este evento, que ha sido reportado entre los días 8,5 a 10 post-estro para el bovino, se ha observado anticipadamente en el bubalino, para el cual se ha reportado la eclosión *in vivo* entre los días 6,5 a 7 post-estro. Es posible que esta diferencia en la fisiología embrionaria determine dificultades tanto en la recuperación de los embriones como en la sincronización con las receptoras.

En coincidencia con lo reportado por otros grupos, el desarrollo embrionario *in vitro* de los embriones bubalinos registrado en el presente trabajo también exhibió diferencias respecto a los embriones bovinos, alcanzándose el estadio de mórula entre los días 3 a 4 de cultivo *in vitro* (vs días 5 a 6 para el embrión bovino). En coincidencia con reportes de otros investigadores, el clivaje y producción de blastocistos de los embriones bubalinos de este estudio preliminar resultaron significativamente menores ($p < 0,05$) que aquéllos observados para el bovino doméstico^{5,9}.

Los datos obtenidos en el presente trabajo constituirían el primer informe de fertilización *in vitro* en el búfalo y producción *in vitro* de embriones luego de la maduración *in vitro* de ovocitos durante el transporte. Se impone la realización de nuevos ensayos para la evaluación de estrategias capaces de mejorar la calidad y competencia de los ovocitos transportados, así como métodos para aumentar las tasas de clivaje y blastocistos del embrión bubalino.

Agradecimientos. Este trabajo fue posible gracias a financiación de la Facultad de Ciencias Agrarias UCA y la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE.

REFERENCIAS

1. Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 28: 717-725.
2. Brackett BG, Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12: 260-274.
3. Crudeli GA, Pellerano GS, Olazarri MJ, Konrad JL, Patiño EM, Cedrés JF. 2008. Efecto de diferentes variables sobre la preñez en búfalas sometidas a sincronización del celo e inseminación artificial a tiempo fijo. *Rev Vet* 19: 14-17.
4. Di Francesco S, Novoa MV, Vecchio D, Neglia G, Boccia L, Campanile G, Zicarelli L, Gasparrini B. 2012. Ovum pick-up and *in vitro* embryo production (OPU-IVF) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology* 77: 148-154.
5. Gasparrini B. 2002. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57: 237-256.
6. Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P. 1987. *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 4: 281-285.
7. Leibfried ML, Crister ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod* 36: 376-383.
8. Marquant B, Gérard M, Solari A, Thibault C. 1989. *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reprod Nutr Dev* 29: 559-568.
9. Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo V, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L. 2003. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123-1130.
10. Parrish JJ, Susko JL, Leibfried ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen semen. *Theriogenology* 25: 591-600.
11. Patiño EM, Crudeli GA, Couto A, Mendes JA. 2008. *Lechería bubalina*, Ed. Moglia, Corrientes (Argentina), p. 21-41.
12. 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.
13. Sirard MA, Blondin P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42: 417-426.
14. Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38: 905-919.
15. Wilmut I, Young L, De Sousa P, King T. 2000. New opportunities in animal breeding and production: an introductory remark. *Anim Reprod Sci* 60: 5-14.