

## FR 32. FERTILIZACIÓN *in vitro* HETERÓLOGA EN BÚFALOS

Pedro Bastidas, Adriana Fernández y Juan Trocóniz

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Apartado Postal 4563 Maracay, Edo. Aragua, Venezuela

### Abstract

#### *In vitro* heterologous fertilization of buffalo oocytes

This study was designed to evaluate both a homologous and heterologous system utilizing frozen semen *Bos taurus*, *Bos indicus* y *Bos bubalis*. Bovine and buffaloes ovaries were obtained from a slaughterhouse and transported to the laboratory in saline solution. A total of 120 bovine and 30 buffalo oocytes were collected from follicles of different sizes. They were cultured in a 35 mm petri dish containing TCM-199 for 24 h. There was a significant ( $P < .05$ ) effect of type of oocyte on fertilization rate. There were more cow oocytes fertilized between 24 and 48 h (68 %) than buffalo oocytes (47 %). However, there were not significant effects ( $P > .05$ ) due to type of semen. In conclusion, this study indicates that it is feasible to incorporate the bovine oocyte system as a laboratory tool to evaluate the fertility potential of semen from *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bos bubalis* breeds.

**Palabras claves:** Fertilización *in vitro*, heteróloga, búfalos, potencial fertilizante.

**Key words:** *In vitro* fertilization, heterologous, buffalo,

### Introducción

La fertilización *in vitro* (FIV) homóloga, ha sido utilizada para evaluar el potencial fertilizante de espermatozoides en diferentes especies de mamíferos, sin embargo, una adecuada provisión de ovocitos constituye un requerimiento básico para el estudio en algunas especies.

En años recientes, la meta de la Industria de la inseminación artificial, ha sido la de obtener un método simple y exacto para la predicción del potencial de fertilidad del semen bovino (Whitfield y Parkinson, 1995). La utilidad de una variedad de métodos de laboratorio para predecir la fertilidad del semen bovino fue examinada por estudios realizados por Lindford *et al.* (1976); sin embargo el examen macro y microscópico del semen (volumen, motilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides anormales) ha tenido un valor limitado en la predicción de la fertilidad (Bishop, 1955; Hirao, 1975; Salisbury *et al.*, 1978). Por consiguiente, el establecimiento de la técnica de FIV heteróloga, utilizando ovocitos de vaca (pues existe una fuente abundante de ovocitos bovinos a nivel de matadero y semen de búfalo) constituiría una metodología útil para evaluar el potencial fertilizante de semen congelado y fresco de búfalos.

El objetivo del presente trabajo fue el de adaptar y validar una técnica de FIV heteróloga, para la evaluación del potencial fertilizante de semen congelado de búfalos en el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.

### Materiales y métodos

Los ovarios de vacas y búfalas fueron obtenidos 30 minutos después de la muerte de los animales en un matadero local, y trasladados al laboratorio en el medio de transporte en un período de dos horas. Se aspiraron 120 ovocitos de vacas y 30 ovocitos de búfalas, provenientes de folículos de diferentes diámetros.

Los ovocitos se maduraron por 24 horas en el medio TCM-199 suplementado con estradiol, suero fetal bovino, gonadotropina coriónica humana y hormona liberadora de gonadotropinas, equilibrado en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub> a una temperatura de 39 °C. Para la fertilización se utilizó semen congelado de toros *Bos taurus*, *Bos indicus* y búfalos de fertilidad comprobada y provenientes de un mismo lote de congelación, el cual fue capacitado con heparina (10 mg/mL).

De los 120 ovocitos de vaca, 40 se expusieron a semen de *Bos taurus*, 40 a semen de *Bos indicus* y 40 a semen de búfalo; así mismo de un total de 30 ovocitos de búfala, 10 se expusieron a semen de *Bos taurus*, 10 a *Bos indicus* y 10 a semen de búfalo. El medio de fertilización utilizado fue el medio Tyrodes modificado (TALP) y las placas de fertilización se llevaron a la incubadora a 39 °C, equilibrada con 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub> en un 100 % de humedad relativa cultivándose durante un período de 24 a 48 horas.

Una vez cumplido el tiempo requerido, los ovocitos fueron transferidos a láminas para su evaluación. Los

ovocitos se fijaron en ácido acético: etanol (1:3) por 24 horas y luego se tiñeron con aceto-orceína 1 % en 40 % de ácido acético y se observaron inmediatamente al microscopio. El análisis de los datos se realizó utilizando el SAS.

### Resultados y discusión

Los resultados indican (cuadro 1) que hubo diferencia significativa ( $P < .05$ ) entre la tasa de fertilización de los ovocitos de vaca (68 %) comparada con los ovocitos de búfala (47 %), no encontrándose diferencias significativas entre la capacidad fertilizante de los diferentes tipos de semen ( $P > .05$ ).

**Cuadro 1. Tasa de fertilización.**

	Semen <i>Bos taurus</i>	Semen <i>Bos indicus</i>	Semen búfalo
Ovocito vaca	25/40 (62.5 %)	30/40 (75 %)	26/40 (65 %)
Ovocito búfala	4/10 (40 %)	5/10 (50 %)	5/10 (50 %)

### Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran la factibilidad de la implementación de la técnica de FIV heteróloga, donde existe una fuente económica de ovocitos bovinos a nivel de matadero, permitiendo incorporar un método de predicción del potencial fertilizante de semen de reproductores de diferentes especies a nivel de laboratorio.

La técnica de FIV heteróloga para la evaluación del potencial fertilizante tanto de semen congelado como de semen fresco puede ser utilizada tanto en sementales bovinos como en cualquier otras especies de interés zootécnico.

### Literatura citada

- Bishop, M. H. W. 1955. Interrelationships of semen characteristics studies on fertility. 7:48-65.
- Hirao, K. A. 1975. Multiple regression analysis on 6 measurements of bovine semen characteristics and fertility. Int. J. Fertil. 20:204-208.
- Lindford, E., F. A. Glover, C. Bishop y D. L. Stewart. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. J. Reprod. Fertil. 47:283-291.
- Salisbury, G. W., N. L. Vandemark y J. R. Lodge. 1978. Physiology of reproduction and Artificial Insemination of Cattle. Chapter 4: Ovogenesis, ovulation and fertilization, 2<sup>do</sup> ed. San Francisco. U.S.A. p.p. 91-129.
- Whitfield, C. H. y T. J. Parkinson. 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore A23187. Theriogenology 44:413-422.