

Biotechnología reproductiva aplicada a la mejora genética de *Bubalus bubalis* en Cuba



Reproductive biotechnology applied to the *Bubalus bubalis* genetic improvement in Cuba

<http://opn.to/a/nITgL>

Mara Dunia Quintana-Utra ^{1*}, Pavel Herrera-Vera ¹, Boris Ramos ², Félix Agüero ³

¹Universidad Agraria de La Habana (UNAH) "Fructuoso Rodríguez Pérez", Carretera Tapaste y Autopista Nacional, Km 23 ½, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT), Ave101, # 6214, Cotorro, La Habana, Cuba

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una metodología para la obtención de embriones en *Bubalus bubalis* en condiciones tropicales. Se trabajó con ovarios de hembras bufalinas faenadas de 66±6 meses de edad y 475±25 kg de peso, de los que se extrajeron los complejos cúmulo-ovocitos inmaduros por el método de punción folicular de los folículos que presentaban diámetros menores de 3 mm, entre 3 y 5; los mayores de 5mm con una aguja de 18 G adosada a una jeringuilla de 10 mL. La maduración *in vitro* se realizó en medio TCM199 y se evaluó mediante la condensación de la cromatina y la presencia del primer cuerpo polar. La fertilización *in vitro* se hizo en medio Talp-Fértil utilizando pastillas de semen bubalino congelado, a una concentración de 4x10⁶ spz/mL. Los embriones se cultivaron sobre una monocapa de células del cúmulo en medio SOFaa. Se contabilizaron 8,02 folículos/ovario de diferentes diámetros con una relación folicular según su diámetro de 53,01 %, 28,23 % y 18,75 %. Se obtuvo 3,93 CCO/ovario de recolección y, a partir de estos, se maduró el 58 %, pasaron a la fertilización en grupos de 25 a 35 ovocitos por 400 µL de medio, llegando al 38,79 % de clivaje y 17 % de embriones bubalinos que desarrollaron adecuadamente hasta blastocito. A partir de estos resultados se concluye que el protocolo más apropiado para la mejora genética de la especie es la combinación de la técnica de punción folicular de los ovarios, seguido de la maduración de los ovocitos durante 24 horas en condiciones similares a las del bovino, pero fertilizados con 4x10⁶ spz/mL, seguido de cultivo en medio SOFaa.

Palabras clave: fertilización *in vitro*, ovocitos, *Bubalus bubalis*.

ABSTRACT: The present work was aimed at establishing a methodology for obtaining *Bubalus bubalis* embryos under tropical conditions. The study was focused on ovaries of slaughtered buffalo females of 66 ± 6 months of age and 475 ± 25 kg of weight, from which the immature cumulus-oocyte complexes were extracted by the follicular puncture method, having diameters less than 3 mm, between 3mm and 5mm; and those greater than 5 mm using an 18 G needle attached to a 10 mL syringe. *In vitro* maturation was carried out in TCM199 medium and it was evaluated by chromatin condensation and the presence of the first polar body. *In vitro* fertilization was performed in Talp-Fertile medium using frozen buffalo semen tablets, at a concentration of 4x10⁶ spz/mL. Embryos were cultured on a monolayer of cumulus cells in SOFaa medium. There were 8.02 follicles/ovary with different diameters: 53.01 %, 28.23 % and 18.75 %. There were 3.93 COC/collection ovaries and, from them, the 58 % was matured. They passed to the fertilization stage in groups of 25 to 35 oocytes per 400 µL of medium, reaching 38.79 % of cleavage and 17 % of buffalo embryos, which developed properly until reaching the blastocyst stage. Based on these results it is concluded that the most appropriate protocol for the genetic improvement of the species is the combination of the follicular puncture method, followed by the maturation of the oocytes for 24 hours under conditions similar to those of cattle, but fertilized with 4x10⁶spz/mL, followed by cultivation in SOFaa medium.

Key words: *in vitro* fertilization, oocytes, *Bubalus bubalis*.

*Autor para correspondencia: Mara Dunia Quintana-Utra. E-mail: mdutra@unah.edu.cu

Recibido: 09/02/2018

Aceptado: 04/10/2018

INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual constituye uno de los principales pilares en el éxito de la producción animal moderna. El máximo aprovechamiento del potencial genético y productivo de los individuos garantiza resultados superiores en este sentido. Para el desarrollo económico de nuestro país urge impulsar la producción animal por su importancia en la alimentación de la población (1).

El uso de las biotecnologías reproductivas coadyuva a un mejor desempeño de la capacidad reproductiva (2), por ejemplo: tratamientos hormonales para la sincronización estral y superovulación de las hembras de alto valor genético y económico, la transferencia de embriones por vía transcervical y la fertilización *in vitro* de óvulos obtenidos a partir de ovarios de hembras sacrificadas en matadero (3). Otras técnicas utilizadas para la multiplicación de individuos de alto valor genético son la bisección de embriones y la clonación somática. Para la conservación de los genofondos se emplean modernas técnicas de crioconservación de embriones y óvulos mediante el principio de congelación conocido como vitrificación (4). El objetivo de la presente investigación fue realizar un reporte detallado de la obtención de embriones bubalinos en condiciones tropicales utilizando ovarios de hembras faenadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 464 ovarios seleccionados por presencia de cuerpo lúteo y folículos visibles, de hembras bubalinas de 66±6 meses de edad y 475 ±25 kg de peso, faenadas en el matadero Valle del Perú que pertenecieron a la Empresa Pecuaria "El Cangre". En el laboratorio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología se extrajeron los complejos cúmulo-ovocito (CCO) mediante punción folicular (PF), con una aguja hipodérmica (18Gx1½, TERUMO), acoplada a una jeringuilla plástica de 10 mL (HSW, Germany), que contenía 1 mL de medio de cultivo 199 Hepes (SIGMA, M7528), más 10 % de Suero Fetal Bovino inactivado (SFBi, PAA) (2), a partir de folículos que se dividieron en menores de 3 mm, entre 3 y 5 y mayores de 5 mm. Los complejos cúmulo-ovocito (CCO) se

localizaron bajo un estereoscopio con 4X de magnificación (Olympus) y su captura se realizó con capilares.

Todos los CCO se clasificaron por la escala de Gupta *et al.* (5) en calidad I, II-III, IV y desnudos o degenerados. Para la maduración se utilizó el medio TCM 199 bicarbonato (M4530) durante 24 h a 39°C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. A las 24 horas de maduración *in vitro* (MIV) se observó la progresión meiótica con aceto-orceína al 1,1 % y la presencia del primer cuerpo polar en el microscopio de contraste de fase (Leyca), con un aumento de 40X.

Para la fertilización se utilizó una pastilla de semen procedente de búfalos seleccionados para sementales del Centro de Inseminación Artificial "Rosafé Signet". Los espermatozoides se capacitaron mediante la técnica de *Swim-up* con el medio Talp-Esperm. Luego se fertilizaron de 25 a 35 ovocitos maduros por pozo en una placa de cuatro pozos con medio Talp-Fertil, con una concentración espermática de 4x10⁶ spz/mL; como estimulante se añadieron 400 µL de penicilamina-hipotaurina-epinefrina (PHE) a una relación de 20:10:2 µM. El cocultivo se realizó durante 24 horas a 39°C, a una atmósfera con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa, sobre una capa de células del cúmulo en medio SOFaa.

Se dividió el proceso por etapas y se calculó el porcentaje en cada una; cada porcentaje se comparó con resultados obtenidos por Camarra *et al.* (6) y Drost (7) para determinar la eficacia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la colección, a partir de 3271 folículos contabilizados, se dividieron en 53,01 % con diámetro menor de 3 mm, 28,23 % con diámetro medio (entre 3 y 5 mm) y 18,75 % con más de 5 mm, donde se ubicaron los folículos de DeGraaf, que se presentan en la especie entre 6,4 y 7,2 mm de diámetro (8). En la primera etapa del proceso, que es la recolección de ovocitos, se llegó hasta 3,93 CCO/ovario. Ohashi *et al.* (9) obtuvieron entre 0,73 y 2,2 CCO/ovario, por lo que se evalúa de buena. Posiblemente se deba a la capacidad reproductiva que tienen las hembras de ciclar todo el año, aunque Almaguer (10) observó una distribución estacional de los partos, atribuible a la temperatura ambiental, al

fotoperiodo y a los aportes de alimentos, pero para la realización del ensayo *in vitro* este comportamiento garantizó una población folicular disponible estable todo el año. Los resultados concuerdan con Huang *et al.* (11), quienes reportaron que el número de ovocitos utilizables en búfalos es de $3,18 \pm 2,89$ por ovario.

Los ovocitos colectados fueron de calidad I (31,9 %), para los grupos de calidad II-III se alcanzó 43,78 %; en los grupos de calidad IV 15,95 % y 8,28 % para los desnudos y atrésicos (12). En cuanto a la calidad los CCO, Neglia *et al.* (13) plantean que se obtienen embriones de mejor calidad con CCO de calidad I, que con los de calidad II-III y IV para ser trasplantados y desarrollar un feto sano a término.

En la Figura 1 se puede observar el comportamiento de todo el proceso por etapas. Se muestra la cantidad de folículos que se contabilizan y la disminución del número de CCO inmaduros por pérdidas de los mismos en el proceso de aspiración.

Luego de la maduración, se procede a la fertilización con 4×10^6 spz/mL, lo que arrojó un 38,79 % de clivaje; de los fertilizados totales se obtuvo el 17 % de blastocisto en medio SOFaa. Nandi *et al.* (14) proponen una concentración espermática para la FIV en la especie de 4×10^6 spz/mL, aunque también se propone un estimulante de la motilidad espermática de 400 μ L PHE, como se realizó en nuestro estudio. Totey *et al.* (15) lograron 40 % de efectividad con la combinación antes mencionada. Se atribuyen los resultados obtenidos a la baja motilidad de los espermatozoides bubalinos, que oscila entre 60 y 75 %. La misma está proporcionalmente relacionada con las características estacionarias del semental bubalino, que presenta en las condiciones de Cuba de 5 a 6 mL de volumen, 70 a 80 % de motilidad, 700 a 800×10^6 spz/mL y 70 a 80 spz vivos, con la presentación de los valores máximos entre los meses de septiembre a febrero (16).

En la Figura 2 se muestran los CCO en las diferentes etapas del proceso de FIV en *Bubalus bubalis*.

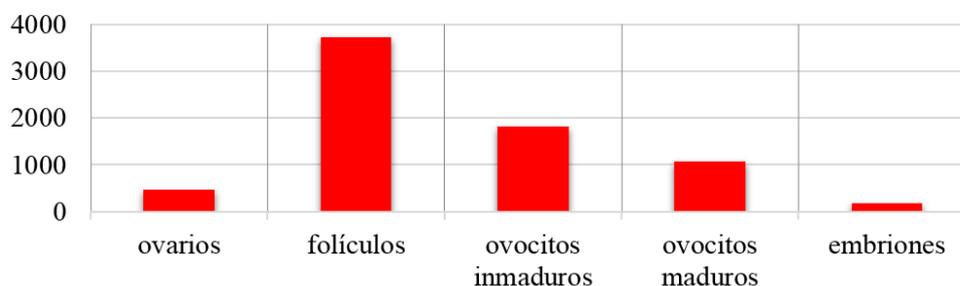


FIGURA 1. Cantidad de ovarios, folículos puncionados, complejos cúmulo-ovocitos inmaduros obtenidos, ovocitos maduros y embriones de búfalas. / Amount of ovaries, punctured follicles, obtained immature cumulus-oocyte complexes, mature oocytes and buffalo embryos.

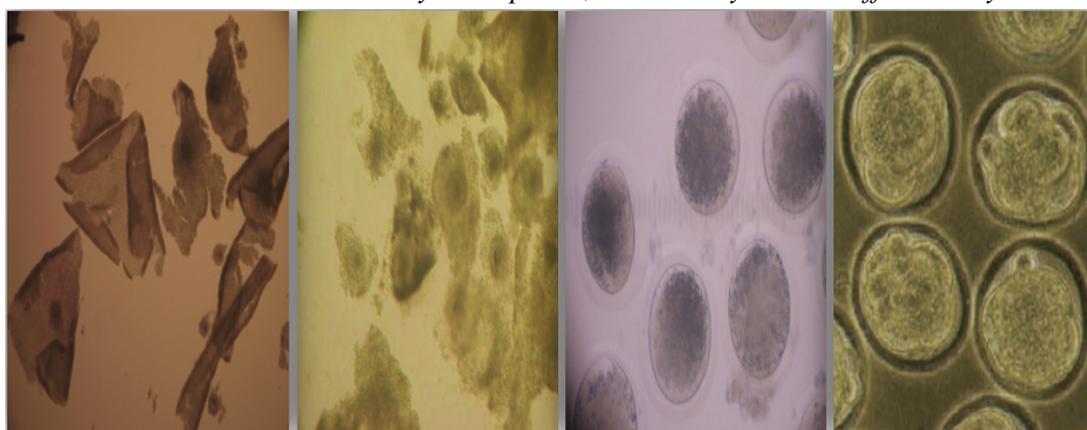


FIGURA 2. CCO en las diferentes etapas del proceso de FIV en *Bubalus bubalis*. a) CCO inmaduros, b) CCO maduros, c) ovocitos desnudos maduros para FIV, d) embriones. / CCO in the different stages of the FVI process in *Bubalus bubalis* a) immature COCs, b) mature COCs, c) mature nude oocytes for FICV, d) embryos.

A partir de los resultados alcanzados se puede concluir que los ovarios de hembras bubalinas, enviadas a matadero, se pueden utilizar, de modo experimental, para la producción de embriones aplicando la metodología y los medios recomendados para la especie.

REFERENCIAS

1. Palma GA. Producción in vitro de embriones bovinos. Biotecnología de la Reproducción. Buenos Aires:Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2001;pp .225-294.
2. Misra AK.Advances in embryo technology in water buffaloes.7th world buffalo Congress, 20-23 October 2004. Makati Shangri-Hotel, Ayala Avenue, Makati city, Philippines. 2004.
3. Singh B, Chauhan MS, Singla SK, Gautam SK, Verma V, Manik RS, et al. Reproductive biotechniques in buffaloes (*Bubalus bubalis*): status, prospects and challenges. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21:499-510.
4. Sá Filho MF, Carvalho NAT, Barucelli OS. Embarazos de búfalo fresca y vitrificados embriones producidos in vitro. *Veterinariae Acta Scientiae.* 2005;33(1):431.
5. Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV. In-vitro maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. *Ind. J. Anim. Sci.* 2002;72:20-23.
6. Gamarra FP, Rendón VV, Chávez AR, Perez LS, Cardona-Maya W, Berdugo JG. Establishing an in vitro production program for buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) in Colombia. *Rev. MVZ Córdoba.* 2015;20(1):4495-4504.
7. Drost M. Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology.* 2007;68(3):450-453.
8. Gimenes LU. Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*). [Tesis de Maestría]. University of São Paulo: São Paulo, Brazil.2006. p. 115.
9. Ohashi OM, Miranda MS, Sousa JS, Sousa AJO, Cordeiro M, Biondi CF. La producción in vitro de embriones de búfalo. *Revista Brasileira Reproducción Animal.* 2003;27:103-108.
10. Almaguer P. El búfalo, una opción de la ganadería. *REDVET*[Internet]. 2007 [Consulta 5 de mayo de 2016] 8(8). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080807.html>.
11. Huang F, Pang C, Zhang X. In vitro fertilization and subsequent embryo development using oocytes derived from abattoir ovaries in different seasons in buffalo. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine.* 2008;35:76-78.
12. Leal LS, Moya-Araújo CF, Fernandes CB, Martins LR, Landim-Alvarenga FC, Oba E. Evaluation of Recovery, Quality and In Vitro Nuclear Maturation of Oocytes Obtained from Buffalo and Bovine Ovaries. 9no Congreso de buffalo. Argentina. 2010.
13. Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. First pregnancies established from vitrified Blastocyst entirely produced in-vitro in Mediterranean Italian buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2003;54:374.
14. Nandi S, Chauhan MS, Palta P. Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized in-vitro. *Theriogenology.* 1998;50:1251-1262.
15. Totey SM, Taneja H, Palwar GP. Comparison between Swim up and Percoll gradient for in vitro-produced buffaloes embryos. *Theriogenology.* 1996;62:311.
16. Ferrer A. Evaluación de la calidad del semen de *Bubalus bubalis* en diferentes épocas del año, diferentes régimen de extracción, diluyentes o conservadores y métodos de congelación. [Tesis Doctoral]. La Habana, Cuba: 2011.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.