

**PRODUCCION DE BÚFALOS GENETICAMENTE SUPERIORES (*BUBALUS BUBALIS*) A TRAVES DE PRODUCCION Y VITRIFICACION DE EMBRIONES *IN VITRO* Y TECNICAS DE TRANSFERENCIA EN FILIPINAS**

**Perry Lorraine HUFANA-DURAN<sup>1</sup>, Danilda HUFANA-DURAN<sup>2,3</sup>,  
and Peregrino G. DURAN<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Investigadores Especialistas, Escuela Superior Politecnica Agropecuaria de Manabí-  
Manuel Felix Lopez, Calceta, Manabí, Ecuador

<sup>2</sup>Prometeo, Universidad Tecnica de Babahoyo, Los Rios, Ecuador

<sup>3</sup>Científicos, Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, Filipina Carabao Center,  
Ciencia Ciudad de Muñoz, Nueva Ecija 3120, Philippines

**RESUMEN**

En *Philippine Carabao Centre* se desarrollan biotecnologías reproductivas en búfalos de agua. Se realizaron tres estudios para evaluar la eficiencia de embriones *in vitro* en animales genéticamente probados. El estudio 1 consistió en conocer la viabilidad de los embriones *in vitro* obtenidos, teniendo como receptoras a búfalos de río ( $2n = 50$ ) por transferencia no quirúrgica. En el estudio 2 se examinó la eficacia de búfalos de pantano ( $2n = 48$ ) como madres receptoras de embriones de búfalo de río. Mientras que el estudio 3 evaluó la posibilidad de embarazo múltiple en búfalos de agua por transferencia de embriones. Los ovocitos se obtuvieron de búfalos de río, ubicados en la India, el procedimiento consistió en la maduración, fecundación y cultivo de ovocitos para el desarrollo embrionario. La fecundación *in vitro* se llevó a cabo utilizando tres principales progenies de toros probados de en *National Dairy Development Board* de la India. Los embriones resultantes se criopreservaron por procedimiento de vitrificación y se transportaron a Filipinas en nitrógeno líquido para la transferencia de embriones. Los resultados para los estudios 1 y 2 fueron una de tasa de preñez 16,36% (9/55) y 12,5% (5/40); mientras que la tasa de parto fue 10,91% (6/55) y 10% (4/40) respectivamente. El 3,8% (1/26) de tasa de gemelos cuando los embriones se transfieren de dos en dos. Los resultados demuestran el potencial que tiene la aplicación de biotecnologías reproductivas avanzadas en un programa de

mejoramiento genético de búfalos de agua.

**Palabras clave:** producción *in vitro* de embriones, criopreservación, vitrificación, transferencia de embriones.

## 1. Introducción

Hay dos tipos de búfalos de agua; el tipo de río ( $2n = 50$ ) y el tipo pantano ( $2n = 48$ ). Los búfalos tipo río son para leche y carne, mientras que el tipo de pantano son animales para trabajo de campo. En Filipinas predomina el tipo búfalos de pantano llamado Carabao. Con la llegada de la mecanización agrícola y el aumento de los insumos en las operaciones agrícolas acompañado por muchas calamidades ambientales que afecta a la productividad de la agricultura, la transformación de los búfalos de pantano en animales lecheros se convirtió en un interés de proporcionar a los agricultores una fuente adicional de ingresos de la venta de leche, frente a los problemas de desnutrición en las zonas rurales, así como la seguridad alimentaria. Filipinas ha sido dependiente de la importación de leche y productos cárnicos durante muchos años, por ello, la producción de animales que podrían producir más leche y carne es una necesidad.

La inseminación artificial (IA) es la primer biotecnología reproductiva utilizada para mejorar búfalos de pantano. Sin embargo, para producir búfalos ribereños de raza pura a través de la IA es un proceso de largo que requiere de 15 a 20 años de retrocruzamiento continuo. La transferencia de embriones (ET) que es ampliamente utilizado en el ganado y otros animales (Scherzer et al., 2008), se ha aplicado para la producción de animales genéticamente superiores. Para facilitar el programa de mejora genética del búfalo de agua, se inició la técnica de transferencia de embriones incluyendo la superovulación y recolección de los embriones *in vivo*, pero la pobre respuesta ovulatoria de búfalos (Cruz et al., 1991; Misra, 1993) con relacion al costo de hormonas limitó su aplicación práctica. La producción *in vitro* de embriones es una tecnología que permite la producción de embriones, tanto de los ovarios obtenidos de mataderos como de óvulos recolectados *in vivo*, incluyendo la colección de óvulos inmaduros, maduración de los ovocitos dentro de un incubador de CO<sub>2</sub>, la fertilización *in vitro* de los ovocitos maduros y el cultivo *in vitro* para el desarrollo del embrión, la

cual se acopla con la criopreservación de embriones y transferencia para producir becerros de la genética deseados. Este trabajo presenta los resultados en la demostración de las técnicas de embriones *in vitro* de producción, la crioconservación y la transferencia de la producción de búfalos genéticamente superiores para el incremento de leche y de carne.

## **2. Metodología**

Diseño Experimental. En el Laboratorio de Embriología satélite en la India se produjeron embriones congelados ( $2n = 50$ ) desde la maduración *in vitro*, fertilización y desarrollo del embrión, luego fueron transportados a Filipinas en nitrógeno líquido para la transferencia de los mismos. Para evaluar la viabilidad y la normalidad de los terneros resultantes (Estudio 1) se llevó a cabo en la reserva genética de Philippine Carabao Center, donde se utilizaron búfalos de río como animales receptores. El Estudio 2 consistió en examinar el uso potencial de los búfalos de pantano como madres de alquiler y evaluar el desarrollo a término de  $2n = 50$  embriones en el útero  $2n = 48$  receptor. El Estudio 3 fue diseñado para evaluar la posibilidad de preñez múltiple utilizando embriones vitrificados producidos *in vitro*.

Producción de Embriones *in vitro*, crioconservación y Transferencia. Los ovocitos se obtuvieron de hembras genéticamente superiores identificadas por la evaluación visual: conformación corporal y tamaño de la ubre. Los animales con altos potenciales de leche tienen ubre grande, con proporciones equilibradas y pezones que son iguales en tamaño. Para la carne, los animales con un cuerpo robusto, en forma de barril, amplio pecho, piernas rectas, los cascos que crecen en el ángulo adecuado y un aspecto bien proporcionado se consideran. Para el semen de toros, fueron adquiridos semen congelado de la *National Dairy Development Board* de la India y utilizados para la fertilización *in vitro*.

El procedimiento detallado en la producción *in vitro* de embriones, crioconservación y transferencia de embriones ya ha sido presentado (Hufana-Durán et al., 2004; 2007; 2008). Brevemente se detalla a continuación: se recogieron ovarios, se y se trasladaron al laboratorio en un termo sellado. Luego, se lavaron con solución salina fisiológica y se aspiraron los complejos cumulus-ovocito (COCs) mediante una

aguja calibre 18 con jeringa de plástico estéril de 10 ml. Los aspirados se agruparon en tubos estériles de 50 ml. Los COCs rodeadas de > 3 capas de células del cumulus y con citoplasma granulado fueron seleccionados y madurados TCM 199 (Sales de Earle con 25 mM HEPES, Gibco-BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) que contiene 10% de FBS (Gibco) y antibióticos (100 unidad de penicilina / ml y estreptomycin 100 mg / mL) cubierto con aceite mineral durante 22 a 24 horas. Se preparó medio de cultivo en gotas de 100 µl en placas de cultivo de tejidos Nunc (35 x 10 mm, Nunclon 153066, Inter-med., Roskilde, Denmark) cubierto con aceite mineral (Embryo probado, Sigma) y se equilibró en incubadora (Forma Scientific Series 3111) con 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 39 ° C. La maduración *in vitro* se llevó a cabo en la misma incubadora.

Para la fertilización *in vitro* (FIV), se descongeló semen de búfalos Murrah a 37°C durante 15 segundos, se dispensó en un tubo esterilizado y se cubrió con 6 ml solución Brackett y Oliphant (Solución BO, Brackett y Oliphant, 1975) precalentado a 37°C que contiene 100 mg / ml de Na-piruvato, cafeína 10 mM y 4 unidades de heparina / ml (mediana lavado de esperma). Las suspensiones de semen se lavaron dos veces por centrifugación a 800 x g durante 8 min se desechó el sobrenadante después de cada lavado. La concentración de esperma se determinó en una cámara de Neubauer y la suspensión de esperma se diluyó 1: 1 (v / v) con solución BO que contiene 10 mg BSA / ml (Fraction V, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) para formar una concentración de esperma final del  $1 \times 10^6$  espermatozoides / ml, la cafeína 5 mM, 2 unidades de heparina / ml y 5 mg de BSA / ml para el medio FIV. Posteriormente, se retiró las células del cumulo y se lavaron dos veces en medio de lavado de los ovocitos pre-incubado y se transfirieron 10 ovocitos a cada gotita de FIV. se cultivó esperma-ovocito en FIV por un período de 6 a 8 h dentro de una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 39°C. Luego los oocitos fueron retirados de la placa de la fertilización, se lavaron cuatro veces y se transfirieron al medio anterior de maduración que contienen células del cumulus y se cultivaron *in vitro* para el desarrollo del embrión. El segundo día del cultivo de embriones *in vitro*, los embriones escindidos fueron separados de los no escindidos y se renovó el medio de cultivo En el estudio 3, la renovación de medio de cultivo *in vitro* se llevó siguiendo el método del sistema de

medios secuencial (Hufana-Duran et al., 2008b). Los embriones que se desarrollaron a las fases de mórula, blastocito temprano, blastocisto y blastocisto expandido respectivamente, fueron criopreservados por el método de vitrificación como se describe por Kasai et al. (1990) y Pedro et al (1999). La vitrificación de embriones se llevó a cabo en una habitación a 25 ° C. cargando los embriones en pajuelas francesas (0,25 ml) con la identificación del embrión. Los embriones se lavaron con medio PB1 (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contiene glucosa 5,56 mM, piruvato 0,33 mM, 100 U de ácido graso de BSA penicilina / ml y 3 mg libre / ml), se expusieron a EFS40 (glicol de etileno, 40%, v / v ; Ficoll, 18%, w / v; sacarosa, 0,3 M) y se colocaron en la punta de la paja abierta en forma puntiaguda dentro de un período de 30 segundos y se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido. Para la transferencia de embriones, los animales receptores fueron tratados con prostaglandina F2 alfa (PGF2) (Prostavet 2 ml im, Virbac laboratorios, Francia) para inducir el estro o se realizó la transferencia del embrión después de la detección del estro natural. Los animales receptores fueron tratados con clorhidrato de lidocaína (2% im, ética Pharmaceutical Co. Pvt. Ltd., India). Para el calentamiento de embriones, se sumergió la punta de la pajilla donde se encontraba el embrión, en una solución 0,5 M de sacarosa a 25 ° C para la re-expansión del mismo. Una vez expandidos, se lavaron en medio PB1 y se cargaron en una pajilla para la transferencia. Durante la transferencia, se comprobó la presencia de cuerpo lúteo mediante palpación por el recto. Primero se insertó un expansor de cuello uterino (FHK, Japón) en la vagina de los animales receptores para una facilitar la penetración de la pistola de transferencia en el cuello uterino. Después se retiró el expansor, se insertó la pistola de ET a la entrada del cuello uterino con una funda exterior. La punta de la pistola se insertó hasta 5-10 cm más allá de la bifurcación externa y se depositó el embrión en el cuerno uterino.

*El diagnóstico de gestación y la tasa de parto.* Se comprobó la persistencia del cuerpo lúteo en animales receptores durante la transferencia de los embriones. La confirmación de preñez se hizo por palpación rectal a 45 y 180 días después de la transferencia. Se registró el número de terneros nacidos a partir de las receptoras paridas.

Los resultados fueron analizados mediante Chi-cuadrado y la prueba exacta de

Fisher para determinar diferencias significativas.

### 3. Resultados y Discusión

La evaluación de la viabilidad de los embriones que fueron desarrollados *in vitro* y posteriormente vitrificados fueron sometidos a evaluación de viabilidad donde el estudio 1 mostró un diagnóstico de preñez con un total de 55 animales receptores, 9 (16,36%) y 6 (10,91%) nacidos vivos, saludables y terneros normales después de un promedio de 312: 8 ± 2: 99 días de gestación (Tabla 1).

**Tabla 1. Terneros nacidos vivos a partir de embriones de búfalos vitrificados obtenidos *in vitro* después de su transferencia**

Número de animales receptores	Número y porcentaje de preñez, n (%)	Número de abortos registrados, n/(%)	Número de nacidos vivos, n/(%)
55	9 (16.36)	3 (5.45)	6 (10.9)

*Hufana-Duran et al. Theriogenology 2004; 61:1429-1439*

En el Estudio 2 (Tabla 2), un total de 40 búfalos de pantano sirvieron como animales receptores. La tasa de preñez fue del 12,5% (5/40). se produjeron cuatro terneros y un 5,0% (4/80) tasa de desarrollo a término y el 10% (4/40) tasa de parto, utilizando búfalos de pantano como receptores de *in vitro*-obtenidos de embriones de búfalo de río vitrificados. De los terneros nacidos tres (75%) fueron entregados vivos y sanos, mientras que uno (25%) enfrentó una muerte fetal causado por distocia.

**Tabla 2. Tasa de Preñez y parto después de la transferencia de embriones de búfalo de río 2n = 50 en hembras receptoras de pantano 2n = 48**

Número de receptoras	Tasa de preñez, %	Tasa de Parto, %		
		Normal	muerte fetal	Total
40	5 (12.5)	3 (75.0)	1 (25.0)	4 (10.0)

*Hufana-Duran et al., Livestock Science 2007; 107:213-219*

En el Estudio 3 (Tabla 3), se obtuvo un 3,8% (1/26) de gemelos y el 19,2% (5/26) nacimientos individuales. La tasa global de partos fue de 23,1% (6/26), comparado con el estudio 1 y otros realizados anteriormente (10.9%, Hufana-Duran

et al. 2004; 13.9%, Hufana-Duran et al. 2005a). El incremento de la tasa de éxito es debió al mejoramiento del sistema de cultivo (uso de sistema secuencial de medios) y el tratamiento de espermatozoides (Hufana-Duran et al., 2005b), el uso de los receptores sometidos a estro espontáneo y la transferencia de embriones en diferentes etapas embrionarias.

**Tabla 3. Producción de terneros por preñez múltiple (2 embriones) de embriones vitrificados de búfalos de agua producidos *in vitro***

Parámetros	Total (%)
Número de embriones transferidos	58
Número de receptores	26
Tasa de nacidos vivos[% por los receptores]	
1 ternero	5 (19.2)
Gemelos	1 (3.8)

*Hufana-Duran et al, Philippine Journal of Science 2008; 107:99-104*

Los resultados del estudio también mostraron que los animales receptores en estro espontáneos o naturales tienen mayor preñez (29% frente a 8,5%) y la tasa de parto (22,6% frente a 5,1%) que los destinatarios con el estro sincronizado (Tabla 4) con partos general tasa de 14,0%. La tasa baja de éxito es atribuido a la dificultad de determinar el momento perfecto de la transferencia de embriones provocada por la falta de signos evidentes de celo en las especies de búfalos de agua que resultaron en la asincronía entre el embrión y el animal receptor. En general, los resultados demostraron una herramienta prometedora para facilitar la mejora genética del ganado en los búfalos de agua. Los resultados del presente documento confirmaron informes anteriores que muestran que en comparación con el ganado, la producción de embriones *in vitro* en búfalos de agua tiene una menor tasa de éxito (Totey *et al.*, 1992; 1993a, b; Neglia *et al.*, 2003). Sin embargo, mediante la aplicación de varias modificaciones, tales como la separación y el uso de espermatozoides móviles para la FIV (Hufana-Duran et al., 2005b), selección de ovocitos de buena calidad para IVM y la mejora del medio de cultivo adecuado para los ovocitos y embriones de búfalo (Hufana-Duran, 2008), las tasas de éxito mejorado a un nivel similar al alcanzado en el ganado vacuno.

**Tabla 4. Preñez y parto tasa después de la transferencia de embriones *in vitro* de embriones vitrificados producidos búfalo de agua (2n = 50) al río (2n = 50) y el pantano (2n = 48) los destinatarios**

Receptores	Estro Natural	Tasa de preñez, % (n/n)	Tasa de Parto (%)
De Río	Espontáneo	28.1 (16/57) <sup>a</sup>	21.1 (12/57) <sup>a</sup>
	Sincronizado	8.3 (2/24) <sup>b</sup>	4.17 (1/24) <sup>b</sup>
De Pantano	Espontáneo	40.0 (2/5) <sup>c</sup>	40.0 (2/5) <sup>c</sup>
	Sincronizado	8.6 (3/35) <sup>b</sup>	5.7 (2/35) <sup>b</sup>
Sub-total	Espontáneo	29.0 (18/62) <sup>a</sup>	22.6 (14/62) <sup>a</sup>
	Sincronizado	8.5 (5/59) <sup>b</sup>	5.1 (3/59) <sup>b</sup>
Total		19.0 (23/121)	14.0 (17/121)

*Las cifras en la misma columna y fila con diferentes superíndices son diferentes (P <0.05)*

En la criopreservación de embriones, la técnica de vitrificación se consideró práctica teniendo en cuenta las eficiencias logradas (Hufana-Durán et al., 2004) y la ausencia de cualquier equipo sofisticado. La consideración más importante para una vitrificación exitosa fue el tipo y concentración del medio de vitrificación, tiempo de exposición, y el material donde se cultivaron los embriones. En este procedimiento, se utilizaron pajuelas Francesas de 0,25 ml para permitir el contacto directo del nitrógeno líquido y vitrificación ultra-rápida.

La transferencia no quirúrgica de embriones en madres receptoras sometidos a estro natural o espontánea se hizo tanto en búfalos de río y pantano. Sin embargo, la tasa de éxito en términos de las tasas de preñez y de parto fue mayor en animales que se sometieron a estro natural que las que se sometieron a estro sincronizado (Hufana-Duran *et al.*, 2004; Hufana-Duran, 2008). La asincronía Embrión- receptor es un gran problema como lo demuestra la ovulación retrasada entre los animales que manifiestan síntomas de estro después de la sincronización del estro.

Con los avances y resultados anteriores, el PCC está explorando más aplicaciones y un alcance más amplio de las biotecnologías reproductivas. Al mismo tiempo, las actividades de receptor de ovúlos, se inició para utilizar hembras vivas de alta genética como fuente de ovocitos con el fin de optimizar la contribución femenina en el progreso genético. El uso de semen sexado para la fecundación *in vitro* y la IA se está llavando a cabo y ha sido considerado para su aplicación.

Un hecho de significativo impacto es el uso de la biotecnología reproductiva que ha contribuido al programa de desarrollo de búfalos en Filipinas. Se llevan a cabo



el fortalecimiento de vínculos de investigación y colaboraciones con socios extranjeros para mejorar y facilitar el desarrollo y la aplicación de para el mejoramiento genético.

## Conclusión

La producción *in vitro* de embriones, vitrificación y transferencia *in vitro* es una herramienta potencial para producir terneros vivos sanos y permite el transporte internacional de germoplasma genéticamente superior eliminando el alto riesgo de transmisión de enfermedades y el alto costo de la importación de animales vivos para los programas de mejoramiento genético. Esta tecnología ofrece un alto potencial para facilitar el mejoramiento genético del ganado, el rescate genético de hembras superiores, y optimizar el rendimiento de la reproducción.

## Referencias

- Brackett BG, Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol Reprod 12: 260–74.
- Cruz LC, HV Venturina, SS Jha, F Adriano, PG Duran, P Serra, OF Smith, PS Faylon, N Lorenzo. Successful transfer of Murrah buffalo embryos into Philippine Swamp buffalo recipients. Proc. 3<sup>rd</sup> World Buffalo Congress, Varna, Bulgaria. 1991;3:586-590.
- Hufana-Duran D, PB Pedro, HV Venturina, PG Duran, LC Cruz. Fullterm development of *in vitro* produced-vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Phil J Sci* 2005a; 134: 89-94
- Hufana-Duran D, PG Duran, Y Kanai, Y Takahashi, LC Cruz. Effect of density gradient sperm separation technique on *in vitro* fertilization potential of frozen semen from bulls with low sperm motility. *Phil Agriculture Scientist* 2005b; 88: 257-267.
- Hufana-Duran D. 2008. Studies for the improvement of *in vitro* culture systems of oocytes and embryos in water buffaloes. Ph. D. Dissertation, University of Tsukuba, Japan. 171 pp.
- Hufana-Duran D, PB Pedro, HV Venturina, RD Hufana, AL Salazar Jr, PG Duran, LC Cruz. 2004. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of *in vitro*-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 61: 1429-1439.

- Hufana-Duran D, PB Pedro, AL Salazar, HV Venturina, PG Duran, LC Cruz. 2007. River buffalo calves (2n=50) delivered to term by swamp buffalo recipients (2n=48) out of *in vitro*-derived vitrified embryos. *Livestock Science* 107: 213-219.
- Hufana-Duran D, PB Pedro, AL Salazar Jr, HV Venturina, PG Duran, Y Takahashi, Y Kanai, LC Cruz. 2008b. Twin calf production in water buffaloes following non-surgical transfer of *in vitro*-produced-vitrified embryos. *Phil J Sci* 2008; 137: 99-104.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990;89:91-7.
- Misra AK. 1993. Superovulation and embryo transfer in buffalo; progress, problems and future prospects in India. *Buffalo J* 9: 13-24.
- Neglia G, B Gasparrini, V Caracciolo di Brienza, R Di Palo, G Campanile, GA Presicce, L Zicarelli. 2003. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123-1130.
- Pedro PB, DH Duran, FP Aquino, R de Vera, M Gunjima, LC Cruz. Cryopreservation of *in vitro* produced swamp buffalo blastocysts by vitrification method. *In: Recent Developments in Animal Production -1999. Proc. 36<sup>th</sup> PSAS Annual Convention, 21-22 October 1999, Heritage Hotel, Pasay City, Metro Manila. Pp. 38-41*
- Scherzer J, RA Fayrer-Hosken, L Ray, DJ Hurley, GL Heusner. 2008. Advancements in Large Animal Embryo Transfer and Related Biotechnologies. *Reprod Dom Anim* 43: 371-376.
- Totey SM, CH Pawshe, GP Singh. 1993a. *in vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*): effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 39: 1153-1171.
- Totey SM, CH Pawshe, GP Singh. 1993b. Effects of bull and heparin and sperm concentration on *in vitro* fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 39: 887-898.
- Totey SM, G Singh, M Taneja, CH Pawshe, GP Talwar. 1992. *in vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fertil* 5: 597-607.