

APLICACION DE LAS BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS EN EL BUFALO EN COLOMBIA.

APPLICATION OF REPRODUCTIVE BIOTECNOLOGIES TO BUFFALO IN COLOMBIA

JESUS ALFREDO BERDUGO GUTIERREZ, DMV, MSc

Director Comité Técnico Asociación Colombiana de Criadores de Búfalos

Asociación Colombiana de Criadores de Búfalos Carrera 36ª No 15-38 of 616 Medellín
Colombia Sur América

jesusberdugo@hotmail.com

Summary: It is necessary to produce sufficient quantities to meet the needs of people and this products must provide the required quality standards to fulfill its nutritional function. Farmers and ranchers should improve the food of animals, increase the number of animals per unit area, care for health conditions, and use reproduction as an aspect of production. To this end, reproductive biotechnologies have been developed by combining advances in genetics, cell biology, and biophysics in order to intervene the fundamental fact of the permanence of living beings in nature: reproduction. This article will review the use of these technologies in an animal species: buffaloes specially in our country, which is working to improve the first requirement and struggles to meet the second one: meat and milk of excellent nutritional quality.

Keywords: Reproduction, buffalo, insemination, embryo.

Por qué producir con búfalos:

El éxito de la ganadería depende en gran proporción de la existencia de animales capaces de producir carne o leche de manera eficiente en diferentes condiciones medioambientales. Nuestro país se ha venido preparando para el establecimiento de una ganadería eficiente, competitiva y sostenible. En nuestro país, más del 40% de la tierra dedicada a la ganadería está ubicada en tierras bajas e inundables, algunas de ellas con proporciones importantes de arvenses (malezas), que impiden la aplicación al 100% de los modelos clásicos de producción. El búfalo se convierte en una alternativa interesante pues puede ocupar tierra donde las explotaciones de vacunos no pueden darse de manera eficiente gracias a que tiene adaptaciones anatómicas y fisiológicas que le permiten transformar eficientemente en carne y leche; puede desplazarse por largos trayectos sin afectar su capacidad productiva y, más aún, puede cargar o tirar una carreta; en fin, es un animal que se enferma poco. La calidad de su carne y leche es excepcional: su proporción de grasa (8%) y de proteína (5%) la convierte en una materia prima invaluable para la industria láctea. Su carne, con 26% de proteína y el nivel más bajo de calorías entre las carnes disponibles en el mercado (131 kilocalorías por 100 gramos), se convierte en una excelente opción para quienes necesiten una dieta sana y balanceada. Finalmente su excelente comportamiento reproductivo les permite cumplir con facilidad aquel parámetro de una cría por año, a pesar de tener una gestación promedio de 305 días.

Contexto de la ganadería bufalina colombiana

En Colombia para 2016 se ha calculado que se tienen alrededor de 600.000 búfalos que representan el 2,6% del hato nacional, están repartidos por todo el país, especialmente en

Antioquia, Córdoba y Santander. Desde el año 2000 se inició el proceso de tener mejores animales, más productivos y de un fenotipo homogéneo, lo que terminó con la apertura de libros de control genealógico para las razas Murrah, Mediterráneo y Colombiano, posteriormente siguiendo la idea de tener mejores animales, se empezó a gestar la idea de producir animales de mejor producción mediante la aplicación de biotecnologías reproductivas.

La inseminación artificial

En 1976 se obtuvieron en Colombia las primeras crías de búfalo por inseminación artificial, pero pasaron muchos años, muchas experiencias desagradables y poco exitosas hasta que en 2002 se volvieron a realizar programas de inseminación artificial (IA) a tiempo fijo. Si bien es cierto se conoce desde hace tiempo, su uso no se ha masificado porque existen muy pocos programas donde se utilice el celo natural. La pobre expresión del celo que dificulta su detección, la variable duración del estro (4-64 horas) y la dificultad en la predicción del momento de la ovulación, explican por qué la aplicación de la IA en búfalos es limitada (De Rensis y López et al 2007; Vale 2011), lo que implica que su aplicación está asociada a la inseminación a término fijo (IATF) utilizando diferentes protocolos de sincronización, entre ellos el más conocido es el OVSYNCH, que se ha propuesto para ser usado en la estación reproductiva favorable de los búfalos. Para la época reproductiva desfavorable se ha sugerido el uso de protocolos basados en el uso de la progesterona como medicamento para preparar el ovario, para el inicio de una onda folicular que termine en una ovulación.

De aquellas épocas se aprendió que los protocolos con progestágenos no funcionaban bien en las búfalas y que la estación reproductiva marcaba definitivamente el éxito de los programas. Entendimos que los animales tienen épocas fértiles y no fértiles; los resultados eran del 36% y del 5%, respectivamente (Perrera, 1977). Con el pobre resultado de la IA en mente y con la constante queja de los criadores, teníamos que buscar alguna alternativa para incrementar las tasas de preñez.

Para fortalecer el uso de esta herramienta, hoy en día se dispone de búfalos de las razas murrah y Mediterráneo traídos del Brasil e Italia, además se han publicado los resultados de la prueba de desempeño a finales del 2015 y fue publicado el primer catálogo de búfalos donde están los valores estimados para cría de los búfalos. Finalmente está estandarizada la técnica de congelación de semen (Ahmad y Chandi, 1980).

Desde aquellos trabajos pioneros y hasta la fecha los resultados no han variado mucho; mantenemos un promedio de 30% de preñez, lo que en términos prácticos significa que para una cría de IA necesitamos inseminar tres búfalas. El más reciente trabajo que mostraremos es aquel realizado por la Asociación al inseminar 856 búfalas durante la estación reproductiva 2015-16 en Colombia. Se les aplicaron los siguientes protocolos: 1. Ovsynch convencional, 2.- Presincronización con prostaglandina, 3.- Adición de cloprostenol en el día de la inseminación 4.- Ovsynch a dosis menores 5.- Ovsynch diferente prostaglandina. Los animales fueron inseminados con reproductores de fertilidad probada, por médicos veterinarios con experiencia en la inseminación de la especie. Para determinar la gestación los animales fueron evaluados por palpación rectal entre 45 y 60 días post inseminación. De las 260 preñeces, los porcentajes de preñez para los protocolos 1, 2, 3, 4, 5 fueron: 33%, 29%, 32%, 23%, 23%, respectivamente. Se debe anotar que en algunos trabajos han logrado hasta un 70%.

Inseminación con celo natural.

Entre los que investigamos en el área, hemos considerado bajos los resultados, especialmente cuando se compara con una especie con tasas de natalidad tan altas, así que se han probado otros protocolos, entre ellos el uso de progestágenos dentro de la estación sin encontrar diferencias significativas, si se ha informado de evaluaciones ecográficas y hormonales que las búfalas tienen una alta variabilidad en términos de niveles hormonales, lo que dificulta la interpretación

de los resultados y pudiera afectar la respuesta a la administración de hormonas exógenas (no se comprende claramente lo anterior).

Inseminación fuera de la estación reproductiva

Uno de los problemas más grandes para la continuidad de los programas de inseminación es la estacionalidad. Recientemente Baruselli (1996) informó resultados alentadores para IA a tiempo fijo fuera de estación mediante el uso de progestágenos. En 2009 se aplicaron los protocolos sugeridos con 35 animales que habían parido más de una vez, entre 60 y 150 días abiertos se les indujo a ovular mediante la introducción de un implante de norgestomet en la oreja y una inyección de valerato de estradiol y norgestomet (Crestar); 7 días después fue retirado el implante e inyectadas con 2 cc de cloprostenol; los animales fueron inseminados a tiempo fijo 60 horas después de retirar el implante. De los 35 animales, se obtuvieron 12 preñeces (34,5 %).

Inseminación con celo natural (se repite nuevamente)

Después de los resultados con la sincronización, se pensó que la mejor forma para incrementar el éxito sería si la búfala se inseminara cuando naturalmente entrara en celo. Empezamos a mirar los factores: la estación (Campanille, 2005), la detección de los celos, la definición del momento de la inseminación y, finalmente, el encaje de ese programa en el trabajo corriente del hato. Se decidió en 2007 hacer los programas con celo natural; se incluyó el uso de calentadores, machos operados que ayudan a mostrar el celo de las búfalas (se les practicó la remoción del epidídimo); se consideró beneficioso para la IA que el macho salte la búfala, pues el salto y la eyaculación facilitan el transporte del espermatozoide hacia la trompa (Zicarelli, 1997). Se decidió que la inseminación se debía hacer 12 horas después que el macho dejara de montar la hembra, se aumentaron las tasas de preñez casi al doble; la tasa de preñez ahora es del 75%. Un problema grande por resolver dentro del programa es la baja tasa de detección de celo: 56%.

En 2009 se decidió inseminar buvillas (que son hembras jóvenes para su primer parto). El principal problema hasta ese momento era pasar el catéter, pero fue solucionado mediante una palpación exhaustiva del mismo: se incluyó en el programa solamente aquellas que mostraban un cérvix más grueso, que nos permitía fijarlo para pasar la pistola de la IA. Se preparó 1 calentador por cada 10 buvillas y se hizo un lote inicial de 40; en un período de dos meses fueron inseminadas 28, de las cuales quedaron preñadas 20, para una tasa de preñez del 71%.

Un reciente estudio de nuestro grupo evaluó de forma controlada protocolos de celo natural y sincronización, fue realizado en una explotación localizada en el departamento de Córdoba (Norte de Colombia), durante la estación reproductiva del año 2015. Se incluyeron 81 búfalas con 61 días abiertos en promedio, que fueron divididas en dos grupos al azar, a la 41 fueron sincronizadas con el protocolo Ovsynch, y 40 fueron inseminadas en celo natural. La detección del celo se realizó mediante observación de los animales dos veces al día y la ayuda de un calentador epididimectomizado, fueron inseminadas 12 horas después de terminar los síntomas de celo. La tasa de preñez para el grupo de celo natural fue de 52,5% y de 36,58 para las búfalas que fueron sincronizadas.

Transferencia de embriones

En nuestro país, los sistemas de cría de búfalos se basan fundamentalmente en el modelo materno haciendo de la transferencia de embriones la biotecnología que mejor se adapta al sistema.

Existen muy pocos informes sobre los resultados de transferencia de embriones utilizando los esquemas tradicionales de superovulación y transferencia de embriones. En la literatura nacional solamente en 2006, Flórez y colaboradores informaron de su experiencia, trabajaron

en la costa norte de Colombia. Se realizaron dos series de 5 búfalas cada una: en la primera serie obtuvieron 17 estructuras de los cuales 4 embriones fueron transferibles; a los 35 días fueron observados preñadas 3 búfalas, sin obtener preñez (definitiva?). En una segunda serie con 5 búfalas, se utilizó la monta natural, se obtuvieron 6 embriones que fueron transferidos para obtenerse una preñez; en resumen.

A fines de 2008, se pensó en el uso de la técnica de producción de embriones *in vitro*. Las experiencias iniciales mostraron algunos hallazgos que ilustraban claramente el efecto de la estación sobre la calidad de los oocitos de las búfalas, fueron aspiradas en diferentes épocas del año; encontrando que en febrero se obtuvieron 9,2 oocitos/búfala, 6,2 viables (rango 4 - 13); en abril fueron 4,0 oocitos/búfala (rango 0-6) y viables 1,3. Se obtuvo un máximo de producción de embriones del 20% y ninguna preñez (Hernandez, 2009).

La experiencia que siguió se realizó en el 2009 mediante la transferencia de embriones congelados producidos *in vitro*, congelados en Glicerol para transferencia directa, esta se realizó en Pueblo Nuevo, Córdoba, con animales multíparos con 90 días posparto, peso de 530 kg y condición corporal de 3,5 promedio. Para la transferencia se escogieron 82 receptoras, entre buvillas y búfalas de primer parto, que fueron sincronizadas con el protocolo combinado de Progesterona-Prostaglandina-GnRh, evaluados los cuerpos lúteos por ecografía previo a la transferencia al cuerno ipsilateral, la cual se hizo el quinto día posterior al momento definido como de celo de la receptora. Cuando los embriones estuvieron en medio de cultivo sin crioprotector fueron montados en pajillas de 0,25 ml previo a la transferencia. De este trabajo se obtuvieron 32 preñeces, en el día 27 pos-transferencia. A la fecha hay nacidos por esta metodología 19 animales, algunos de ellos ya parieron.

Posteriormente se realizaron trabajos de transferencia de embriones con celo natural, una vez estandarizadas las técnicas de congelación de embriones para transferencia directa. En este trabajos se transfirieron 47 embriones a receptoras en día 7 post estro obteniendo tazas de preñez del 35 %.

Finalmente a finales de la estación reproductiva del año 2015, dentro del programa de mejoramiento genético impulsado por la Asociación se hizo el primer trabajo de transferencia de embriones frescos y se empezó a trabajar en la aplicación de estos programas en las fincas.

El primer trabajo fue para determinar el efecto de la aspiración folicular sobre la futura fertilidad de las búfalas. Se aspiraron 33 búfalas pluríparas y se hicieron dos grupos, uno en el cual fueron sometidas a aspiración folicular y otro como control, que consistió en animales con el mismo manejo pero que no fueron aspiradas. Se obtuvo un promedio de 8,5 oocitos/animal. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, el 100% de los animales parieron un bucerro dentro del primer año después de la aspiración, lo que significa que no se afectó la reproducción de los animales ($p=0.0848$), aun cuando estas fueron aspiradas estando gestantes, 33% y 50% para aspiradas y no aspiradas respectivamente. Durante el final de la estación reproductiva del 2015 se realizó otra serie de trabajos de embriones, en este caso en tres fincas, Fueron aspiradas 37 búfalas, en las que se obtuvieron 317 oocitos, de ellos se produjeron 51 embriones, que fueron transferidos a 37 receptoras, obteniendo una tasa de preñez a los 45 días de 28 %. Es de anotar que durante la gestación se perdieron el 50% de las gestaciones, a la fechas estamos esperando el nacimiento de 7 animales derivados de este trabajo.

Clonación.

Finalmente a finales del 2014, nuestro país tuvo el nacimiento de nuestro primer Clon, resultado del esfuerzo de un criador que creyó en el talento criollo (nacional) y le apostó a un laboratorio de biotecnología donde se realizaron los procedimientos que a continuación se describen, se es consciente que la clonación mediante la transferencia de células somáticas, es una gran alternativa para el aprovechamiento de animales superiores. Shi y col (2007) informaron el primer clon de búfalo en el mundo. En el trabajo realizado en nuestro país se obtuvieron fibroblastos de búfalo que fueron obtenidos de la oreja de la donadora, inducidos a detener su

ciclo celular en fase G₀/G₁ (Shingla, 2010) .Paralelamente, fueron obtenidos oocitos de búfala por aspiración folicular, de folículos entre 3 to 6 mm , los oocitos fueron madurados in vitro por 24 horas, posteriormente fueron enucleados y los núcleos de los fibroblastos introducidos en los oocitos para el desarrollo del embrión. Veintidós blastocistos fueron obtenidos al día 7 de cultivo y fueron transferidos a 21 receptoras sincronizadas, de estas 4 fueron diagnosticadas preñadas en el día 60 de gestación. Una receptora preñada murió por un accidente ofídico en el día 170 de gestación. Dos reabsorbieron y una receptora llegó a término y parió naturalmente una hembra el 24 de Diciembre del 2014, a los 314 días de gestación, bien adaptada y sin problemas de salud.

Toda la información presentada muestra el interés de los bufalistas colombianos por tener búfalas productivas acordes a todos los avances en investigación existentes. Habrá que hacer esfuerzos por masificar las técnicas y así poder aprovechar todo el potencial de las mismas.

Bibliografía

Flórez Machado, Eduardo et ál. (2006). «Transferencia de embriones en búfalos en Colombia». En: Memorias III Simposio de Búfalos de las Américas. Medellín, septiembre, pp. 152-154.

Hernández, Carlos et ál. (2009). «Aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU) y producción de embriones in vitro en búfalas de agua (*Bubalus bubalis*) en el trópico bajo colombiano». En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, Vol. 22, N° 3, pp. 567-567.

Baruselli, PietroSampaio (1996). «Reprodução de bubalinos». En: Anais: I Simpósio Brasileiro de Bubalinocultura. Cruz das Almas, p. 117-153.

Perera, M. A. et ál. (1977). «Synchronisation of Oestrus and Fertility in Buffaloes Using a Prostaglandin Analogue».En: Veterinary Record, Vol. 101, N° 26-27, pp. 520-521.

Campanile, G. (2005). «Embryonic Mortality in Buffaloes Synchronized and Mated by AI During the Seasonal Decline in Reproductive Function». Theriogenology, Vol. 63, N° 8, pp. 2.334-2.340.

Ahmad, K. y Chaudhry, R. A. (1980). «Cryopreservation of buffalo semen». Veterinary Record, Vol. 106, N° 9, pp. 199-201.

Zicarrelli, L. et ál. (1997). «Effects of Using Vasectomized Bulls in Artificial Insemination Practice on the Reproductive Efficiency of Italian Buffalo Cows». Animal Reproduction Science, Vol. 47, N° 3, pp. 171-180

Shi,E., Fenghua Lu, Yingming Wei, Kuiqing Cui, Sufang Yang, Jingwei Wei, and Qingyou Liu Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Cloned by Nuclear Transfer of Somatic Cells. Biology of Reproduction 77, 285–291 (2007)

Singla SK, Singh B, Shah RA, George A, Chauhan MS, Manik RS and Palta P 2010. Cloning in buffalo-scope and limitation. Proceedings of the International Buffalo Congress, New Delhi, India, 1–4 February, pp. 70–75.

De Rensis F and López Gatiús 2007 Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. Theriogenology, 67 (2): 209- 216

Vale G W 2011 Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistida. Tecnología en marcha, 24 (5): 5- 18