



Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos a partir de ovarios de búfalas (*Bubalus bubalis*) faenadas

Comparison of two methods of oocyte collection from the ovaries of slaughtered buffaloes (*Bubalus bubalis*)

Helena Navarro Quevedo *, José Miguel Sánchez Pellitero *, Ingrid Avila Pérez *, Camila Hernández Jústiz *

*Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical, La Habana, Cuba.
Correspondencia: hnavarroquevedo@gmail.com

Recibido: Julio, 2025; Aceptado: Agosto, 2025; Publicado: Septiembre, 2025.

INTRODUCCIÓN

En condiciones naturales y bien manejadas, el búfalo presenta buenos índices reproductivos y productivos. La producción *in vitro* de embriones (PIVE) se ha utilizado comercialmente para potenciar este resultado, al maximizar el número de la descendencia de hembras seleccionadas y reducir los intervalos generacionales. Además, ofrece la posibilidad de fecundar los ovocitos de hembras prepúberes, gestantes o faenadas (Kumar *et al.*, 2023).

El número de ovocitos de calidad por ovario es una importante consideración en la PIVE, no obstante, para su obtención es necesario escoger una técnica apropiada bajo condiciones específicas (Kumar *et al.*, 2023). Dentro de los métodos más utilizados para la recuperación de ovocitos de ovarios de búfalas faenadas, se encuentra la aspiración folicular con jeringuilla y el *slicing*; destacando el *slicing* como método preferencial por la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos (Parmar *et al.*, 2022). A pesar de que el método de aspiración constituye una técnica más rápida y práctica que permite el procesamiento de un mayor número de ovarios (Pitroda *et al.*, 2021).

En ninguno de los trabajos reportados anteriormente se abordó la técnica de punción folicular en ovarios recuperados de búfalas faenadas, utilizando bomba de vacío, cuyo beneficio es establecer

Como citar (APA) Navarro Quevedo, H., Sánchez Pellitero, JM, Ávila Pérez, I., & Hernández Jústiz, C. (2025). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos a partir de ovarios de búfalas (*Bubalus bubalis*) faenadas, 37. <https://apm.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e179>



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

una presión de aspiración medible y constante durante todo el proceso. Teniendo en cuenta los planteamientos anteriores se asume que la utilización de la bomba de vacío debía mejorar la tasa de recuperación de ovocitos. Por tanto, el objetivo de este trabajo es comparar el efecto de las técnicas de *slicing* y punción folicular con bomba de vacío, en cuanto a cantidad y viabilidad de los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de búfalas (*Bubalus bubalis*) faenadas.

DESARROLLO

La colecta de los ovarios se realizó en la loza sanitaria perteneciente a la Empresa pecuaria-genética Bacuranao, ubicada en la provincia de La Habana. Los animales, búfalas de río (*Bubalus bubalis*), se sacrificaron mediante choque eléctrico y desangrado por yugulación. Los ovarios fueron recuperados directamente del animal y colocados en 500 ml de solución de salina al 0,9% atemperada a 38.5°C y fueron trasladados en neveras termostáticas en un tiempo de dos horas posteriores a la colecta.

Los ovarios fueron procesados en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida del Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT). Se realizaron tres lavados con Solución buffer fosfatada (PBS) + 0,1mg/ml Kanamicina (SIGMA, K1377-25G) atemperada a 38.5°C. Los ovarios se distribuyeron aleatoriamente entre los dos tratamientos aplicados, obtención de ovocitos con bomba de aspiración y obtención de ovocitos por *slicing*.

La aspiración folicular con bomba de vacío (Minitube, 23362/0000) se realizó con aguja corta de 18G y una presión que correspondiera a un goteo de 20 gotas por minuto. Se aspiraron los folículos de 2 a 6 mm de diámetro, y los complejos cúmulo-ovocitos (CCOs) resultantes se depositaron en viales de 50 ml, previamente cargados con cinco mililitros de medio de recolección de ovocitos [PBS + 1% Suero Fetal Bovino (SFB) (Capricorn, FBS-12B) + 0,1mg/ml Kanamicina (SIGMA, K1377-25G) + 2,4 x10³ mg/ml Heparina (SIGMA, H3149-25KU)] atemperado a 38.5°C.

Para el desarrollo del método de *slicing* se tomaron los ovarios con una pinza y con una cuchilla (bisturí no. 22) se realizaron cortes en toda la superficie ovárica (folículos de 2 a 6 mm de diámetro). Durante y al finalizar la operación, el ovario se lavó con medio de recolección de ovocitos (100 ml) previamente calentado a 38.5°C y se depositaron los CCOs resultantes y el líquido folicular en un vaso de precipitado.

Los CCOs y el líquido folicular contenidos en los viales y el vaso de precipitado se diluyeron en medio de lavado [TCM199-Hepes (SIGMA, M-2520) + 0,1mg/ml Kanamicina + 1% SFB (Capricorn, FBS-12B) + 0,336 mg/ml NaHCO₃ (SIGMA, S5761-500G)] y se localizaron bajo visión estereoscópica 4x de magnificación (Olympus, ZS51); en placas de 120 mm (Greiner, 688102). El trabajo se realizó sobre platinas térmicas (12055/0003) previamente atemperadas a 38.5°C, en cabina de flujo laminar horizontal (Labconco, 64132). Los CCOS se clasificaron y

separaron según su calidad morfológica para las características de la membrana, el citoplasma y el cúmulo apreciables al estereomicroscopio, tomando en cuenta las adecuaciones planteadas por Dubeibe (2021) para búfalos.

Los CCOs se lavaron cinco veces en placas Petri de 35 mm (Nunc, 174943) con medio de lavado. El proceso de maduración se realizó en 500 µl de medio BO-IVM (IVF Bioscience, 71002), en placas de cuatro pozos (Thermo Scientific, 10404532). Se colocaron en incubadora de CO₂ (Nuaire, NU-5100E) a 38,5°C, 5% de CO₂ y en condiciones de máxima humedad (> 90% de humedad relativa) durante 20 horas.

Para la fertilización se emplearon pajuelas de semen congelado de búfalo. La separación espermática se realizó con medio comercial BO-SemPrep (IVF Bioscience, 71003). Posteriormente se evaluó la motilidad y conteo espermático en cámara de Bürker (Marienfeld-Superior, PM-0610230), ambos pasos se realizaron en microscopio invertido de contraste de fase (Axiovert, 35M).

Los CCOs maduros se trasladaron a 500 µl de medio BO-IVF (IVF Bioscience, 71003) cada uno, en placas de cuatro pozos; junto con 4x10⁶ espermatozoides por mililitro. Se colocaron en incubadora de CO₂ a 38,5°C, 5% de CO₂ y en condiciones de máxima humedad durante 21 horas. Pasado este tiempo, los presuntos cigotos se decumularon utilizando Vórtex (Heidolph Top-Mix, 94323) durante tres minutos y treinta segundos a 323 g, en viales de 15 ml en dos mililitros de TCM 199. Posteriormente se lavaron cinco veces en placas Petri de 35 mm, con este mismo medio. Se procedió a llevar los presuntos cigotos a 500 µl de medio de cultivo BO-IVC (IVF Bioscience, 71005) en placa de cuatro pozos, la cual fue colocada en incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ y en condiciones de máxima humedad. A los cinco días, se evaluó el estadio.

Los datos se procesaron y graficaron en el Microsoft Excel 2007 y se realizó una prueba de comparación binomial de proporciones ($\alpha=0,05$), en el programa Minitab 14 para determinar la existencia o no de diferencias significativas.

Con la aplicación de los dos métodos, *slicing* y aspiración folicular con bomba de vacío, se obtuvo el mismo número de CCOs. En cuanto a la viabilidad de estos para la maduración *in vitro*, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 1). Se observó al estereoscopio, mayor número de capas de células del cúmulo en aquellos ovocitos que se obtuvieron mediante la técnica del *slicing*. Sin embargo, mediante esta técnica, también se encontró la presencia de CCOs con un cúmulo muy expandido, no aptos para comenzar el proceso de PIVE. Según las recomendaciones planteadas por Dubeibe (2021) se consideraron viables aquellos CCOs entre la categoría I y III, y solo se descartaron aquellos con el cúmulo con poca compactación, clasificados como categoría IV.

Tabla 1. Clasificación de los CCOs de búfalo obtenidos por cada técnica. Porcentaje de CCOs viables para la maduración (categoría I a la III). Comparación de proporciones ($p>0,05$, $gl=1$).

CCOs por categoría	Método	
	Punción con bomba de vacío	<i>Slicing</i>
I	0	1
II	2	4
III	9	4
IV	0	2
% viables para la maduración	100 % ^(a)	81,8 % ^(a)

En cambio, Parmar *et al.* (2022) plantearon la técnica del *slicing* como el método más eficaz de obtención de ovocitos, sin embargo, los autores lo comparan con la aspiración folicular con jeringuilla y no con bomba de vacío. Siendo este el primer trabajo donde se reporta esta técnica en ovarios de búfalas recuperados después del sacrificio.

En cuanto al porcentaje de división (75% para el método con bomba de vacío y 50% con *slicing*) no se encontraron diferencias significativas en la aplicación de ninguna de las técnicas (Fig. 1A). Tampoco en cuanto a la tasa de embriones transferibles obtenidos, mórulas y blastocistos (62,5% para el método con bomba de vacío y 50% con *slicing*) (Fig. 1B).

Estos valores son superiores a los reportados por Quintana *et al.* (2018), quienes obtuvieron un 38,79% de clivaje y un 17% de embriones transferibles en nuestro país con el método de aspiración por jeringuilla. Avalos *et al.* (2022) reportaron tasas de clivaje semejantes (63,15%) al utilizar los mismos medios y protocolos que los aplicados en este trabajo y la técnica de aspiración folicular con jeringuilla.

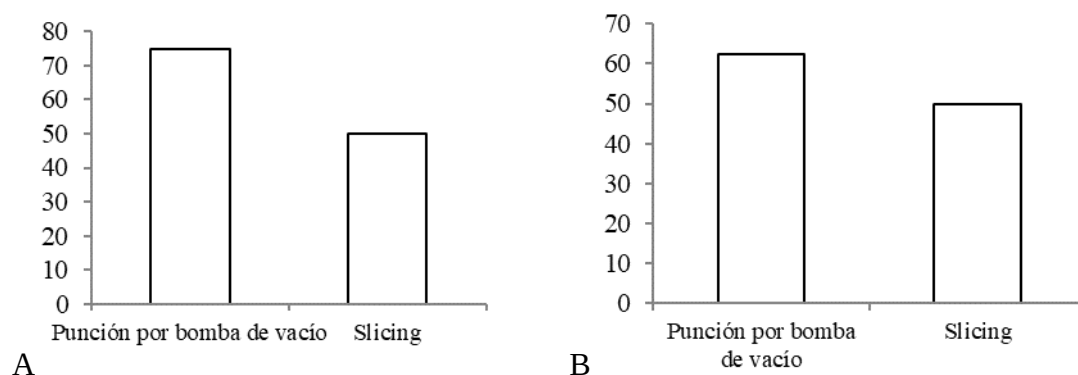


Figura 1: Porcentaje de A: clivaje y B: embriones transferibles, obtenidos por producción *in vitro* en búfalo mediante dos técnicas de recolección de ovocitos, aspiración folicular con bomba de vacío y *slicing*. Comparación de proporciones. (* $P>0,05$, $gl=1$).

CONCLUSIONES

Se concluye que puede ser utilizada la bomba de vacío para la aspiración de folículos en ovarios de búfalas faenadas, alcanzando resultados similares a los obtenidos con el método de *slicing*, en cuanto a cantidad y viabilidad de los CCOs, alcanzando estadios transferibles.

REFERENCIAS

- Avalos, I. I., Guevara, O. E., Kjelland, M., Espín, L. T., Domínguez, B., & Barrientos, M. (2022). Evaluation of the maturation time of abattoir-sourced water buffalo (*bubalus bubalis*) oocytes fertilized *in vitro*. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, 43(12), 30-36. <https://researchgate.net/publication/361465212>
- Dubeibe, D. F. (2021). Desafios técnicos e biológicos na produção *in vitro* de embriões de búfalo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 45(4), 418-425. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.056>
- Kumar, S., Chaves, M. S., Bezerra A. F., Gomes, W., Tavares, S., Ferreira, J. C., Magalhes, L., & Figueiredo, V. J. (2023). Factors affecting the *in vitro* embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. *Veterinary Medicine*, 68(2), 45-56. <https://doi.org/10.17221/48/2022-VETMED>
- Parmar, K. H., Raval, R. J., Vala, K. B., & Patbandha T. (2022). Assessment of oocyte retrieval and its quality from the abattoir ovaries of jaffarabadi buffaloes by aspiration and slicing methods. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 18(3), 35-38. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.18.3.8>
- Pitroda, M. H., Khillare, K. P., Amle, M. B., Rangnekar, M. N., Meshram, M. D., & Mali, A. B. (2021). Recovery of oocytes from ovarian follicles by aspiration method in buffaloes. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(1), 2124-2129. <https://entomoljournal.com/archives/?year=2021&vol=9&issue=1&Articled=8448>
- Quintana, M. D., Herrera, P., Ramos, B., & Agüero, F. (2018). Biotecnología reproductiva aplicada a la mejora genética de *Bubalus bubalis* en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 40(3). <https://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/997>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: HNQ, JMSP, CHJ; análisis e interpretación de los datos: HNQ, JMSP, IAP, CHJ, redacción del artículo: HNQ, JMSP, IAP

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.