

BOT-131 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 285-286, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc128>

Oxamflatin and ascorbic acid improves developmental competence and quality of buffalo (*Bubalis bubalis*) cloned embryos

Sonal Gupta, Gaurav Tripathi, Kartikey Patel, Ram Parsad, Tanya Gupta, Naresh L. Selokar, Manoj Kumar Singh*

Embryo Biotechnology Lab, Animal Biotechnology Division
ICAR- National Dairy Research Institute, Karnal-132001,
India

*Corresponding author: Manoj Kumar Singh (manoj.singh@icar.gov.in).

ABSTRACT

Buffalo cloning is a powerful assisted reproductive tool for multiplying elite buffalo germplasm. However, the live offspring production efficiency is low due to aberrant epigenetic reprogramming. Aberrant epigenetic marks can be modified by culturing donor cells and/or one cell stage fused embryo or both with epigenetic modifiers alone or in combination. In the present study, we examined the effect of oxamflatin (OxF), ascorbic acid (AA), and their combined (OxF+AA) effect on *in vitro* developmental competence, quality, and pregnancy establishment rate of buffalo cloned embryos. Oxamflatin is a histone deacetylase inhibitor, whereas ascorbic acid is a hypomethylating agent. To achieve this aim of the study, reconstructs (fused two enucleated ooplasm + donor cell) were cultured for 8 h, i.e., 4 h post-fusion and 4 h post-activation with 1 μM oxamflatin (OxF), 50 μM ascorbic acid (AA), and there combined (OxF+AA) treatment. There was no significant ($p < 0.05$) difference in cleavage rates when reconstructs were treated with oxamflatin (81.34 \pm 0.81%), ascorbic acid (82.76 \pm 0.51%), combined treatment (82.17 \pm 0.54%) compared with control (82.87 \pm 0.63%). The blastocyst production rate was significantly higher ($p < 0.05$) in combined treatment OxF+AA (41.64 \pm 0.95%) as compared to OxF (34.88 \pm 1.22%), AA (38.99 \pm 0.69%) and control (30.29 \pm 0.77%). The TUNEL assay showed a significantly lower ($p < 0.05$) apoptotic index in combined (OxF+AA) treatment (1.43 \pm 0.43) as compared to oxamflatin (3.54 \pm 0.46), ascorbic acid (3.24 \pm 0.49) and control (5.06 \pm 0.48). The cloned embryos were transferred to the synchronized recipient ($n=15$ to 18 buffaloes in each group), and the conception rate was observed better in combined treatment (OxF+AA) (46.66%) than oxamflatin (16.66%) and ascorbic acid (12.50%). At the same time, no pregnancy was reported in the control group. In conclusion, the combined treatment with oxamflatin and ascorbic acid improves the *in vitro* and *in vivo* developmental potential in buffalo-cloned embryos, which could probably be due to decreased methylation and increased acetylation of the embryos.

Keywords: oxamflatin, ascorbic acid, buffalo cloning, epigenetic reprogramming, pregnancy.

La oxamflatina y el ácido ascórbico mejoran la capacidad de desarrollo y la calidad de los embriones clonados de búfalo (*Bubalis bubalis*)

Sonal Gupta, Gaurav Tripathi, Kartikey Patel, Ram Parsad, Tanya Gupta, Naresh L. Selokar, Manoj Kumar Singh*

Laboratorio de Biotecnología de Embriones, División de Biotecnología Animal

ICAR- Instituto Nacional de Investigación Láctea,
Karnal-132001, India

*Autor de correspondencia: Manoj Kumar Singh (manoj.singh@icar.gov.in).

RESUMEN

La clonación de búfalos es una poderosa herramienta de reproducción asistida para multiplicar el germoplasma de búfalos élite. Sin embargo, la eficiencia de la producción de crías vivas es baja debido a una reprogramación epigenética aberrante. Las marcas epigenéticas aberrantes se pueden modificar cultivando células de un donante y/o un embrión fusionado en etapa celular o ambos con modificadores epigenéticos solos o en combinación. En el presente estudio, examinamos el efecto de la oxamflatina (OxF), el ácido ascórbico (AA) y su efecto combinado (OxF+AA) sobre la competencia del desarrollo *in vitro*, la calidad embrionaria y la tasa de establecimiento de la preñez de embriones clonados de búfalo. La oxamflatina es un inhibidor de la histona desacetilasa, mientras que el ácido ascórbico es un agente hipometilante. Para lograr este objetivo del estudio, se cultivaron reconstrucciones (dos ooplasmas enucleados fusionados + células del donante) durante 8 h, es decir, 4 h después de la fusión y 4 h después de la activación con 1 μM oxamflatina (OxF), 50 μM de ácido ascórbico (AA), y allí tratamiento combinado (OxF+AA). No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en las tasas de escisión cuando las reconstrucciones se trataron con oxamflatina (81,34 \pm 0,81%), ácido ascórbico (82,76 \pm 0,51%), tratamiento combinado (82,17 \pm 0,54%) en comparación con el control (82,87 \pm 0,63). %. La tasa de producción de blastocistos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento combinado OxF+AA (41,64 \pm 0,95%) en comparación con OxF (34,88 \pm 1,22%), AA (38,99 \pm 0,69%) y control (30,29 \pm 0,77%). El ensayo TUNEL mostró un índice apoptótico significativamente menor ($p < 0,05$) en el tratamiento combinado (OxF+AA) (1,43 \pm 0,43) en comparación con oxamflatina (3,54 \pm 0,46), ácido ascórbico (3,24 \pm 0,49) y control (5,06 \pm 0,48). Los embriones clonados fueron transferidos a hembras receptoras sincronizadas ($n=15$ a 18 búfalas en cada grupo), y la tasa de concepción se observó mejor en el tratamiento combinado (OxF+AA) (46,66%) que con oxamflatina (16,66%) y ácido ascórbico (12,50%). Al mismo tiempo, no se informó ninguna preñez en el grupo de control. En conclusión, el tratamiento combinado con oxamflatina y ácido ascórbico mejora el potencial de desa-

Acknowledgement: This work was financially supported by Buffalo Cloning Project (NASF/BGAM(SM)-9001/2022-23) ICAR-NASF, New Delhi.

rrollo *in vitro* z la competencia *in vivo* en embriones clonados de búfalo, lo que probablemente podría deberse a una disminución de la metilación y un aumento de la acetilación de los embriones.

Palabras clave: oxamflatina, ácido ascórbico, clonación de búfalos, reprogramación epigenética, embarazo.

Reconocimiento: Este trabajo fue apoyado financieramente por Buffalo Cloning Project (NASF/BGAM(SM)-9001/2022-23) ICAR-NASF, Nueva Delhi.