

Uso de la vagina como alternativa para la producción de embriones de bovinos

ARTÍCULO
CORTO

Cesar Augusto Pinzón-Osorio¹, Pablo Acosta-Galindez¹, Richard Cristancho-Mendoza¹,
Catalina Vélez-Jaramillo¹, Jorge Pinzón-Porras¹, Jesús Berdugo-Gutiérrez¹, Jorge
Zambrano-Varón¹, Claudia Jiménez-Escobar¹

¹ *Grupo de Investigación en Reproducción Animal y Salud de Hato, Laboratorio de Biotecnología Reproductiva. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.*

cjimeneze@unal.edu.co

(**Recibido:** 1 de julio de 2015 **Aprobado:** 28 de Agosto de 2015 **Actualizado:** 7 de Diciembre de 2015)

DOI: 10.17151/vetzo.2015.9.2.5

RESUMEN: La producción de embriones *in vitro* (PIV), es una alternativa para la multiplicación de animales de genética superior. Los altos costos para el establecimiento de los laboratorios y las bajas tasas de producción de embriones hacen que los investigadores busquen alternativas que simplifiquen y mejoren el proceso. El cultivo intravaginal de embriones es un sistema que utiliza un dispositivo (INVO) que introducido en la vagina genera las condiciones de temperatura y humedad necesarias para el desarrollo del embrión. No hay informes de la aplicación de esta técnica en la PIV en bovinos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso del sistema INVO para la producción de embriones bovinos, el cual evaluó la permanencia del dispositivo en la vagina durante (3 días) y la producción de embriones. En la fase I se realizaron 14 repeticiones en tres vacas, mientras que para la fase II se cultivaron 191 presuntos cigotos. La tasa de permanencia del INVO en la vagina fue del 92,9 % (13/14). Fueron recuperados el 91,9 % (158/172) de las estructuras puestas en cultivo. El clivaje total del grupo INVO fue de 47,2 % (42/84); la proporción de embriones con 8 y 16 células fue de 9,6 % y 4,5 %, respectivamente; los embriones cultivados por tres días adicionales en el laboratorio produjeron blastocitos. Los resultados obtenidos permiten mostrar la factibilidad del sistema INVO para la producción de embriones, siendo posible que continúen su desarrollo hasta estados susceptibles de ser transferidos. La tasa de desarrollo y clivaje es comparable con lo obtenido en condiciones totalmente *in vitro*, de 8 y 16 células.

Palabras clave: INVO, PIV, cultivo, clivaje

Use of the vagina as an alternative for bovine embryo production

ABSTRACT: *In vitro* embryo production (IVEP) is an alternative for multiplying genetically superior animals. The high cost for the establishment of laboratories and the low embryo production rates make researchers seek alternatives to simplify and improve the procedure. The Intra Vaginal Embryo Culture is a system using a device (INVO) inserted into the vagina that creates the conditions of temperature and humidity necessary for the development of the embryo. There are no reports of the use of INVO for the *in vitro* production of bovine embryos. The objective of this study was to evaluate the use of the INVO system for bovine embryo production which evaluated the permanence of the device in the vagina for three (3) days and the production of embryos. In phase one, 14 repetitions were performed in three cows while in phase two 191 presumptive zygotes were cultured. The retention rate of the INVO device in the vagina was 92.9% (13/14). A total of 91.9% (158/172) of the structures placed in culture were recovered. The total cleavage of the INVO group was 47.2% (42/84), and the rate of production of 8 and 16 cell embryos was 9.6% and 4.5%, respectively. The embryos obtained after vaginal culture that were cultured in the laboratory for three additional days produced blastocysts. The results obtained show the feasibility of the INVO system for bovine embryo production, making possible embryo development to stages that can be transferred. The development and cleavage rates are comparable to those obtained under totally *in vitro* conditions from 8 to 16 cells.

Key words: INVO, IVEP, culture, embryo

Introducción

El cultivo intravaginal de embriones es una técnica de reproducción descrita por Ranoux et al. (1988), donde se utiliza un dispositivo llamado INVO para la producción de embriones. En humanos se han reportado embarazos obtenidos por esta metodología desde 1997 (Batres et al., 1997). Este dispositivo se desarrolló como una alternativa para la producción de embriones humanos, para facilitar el manejo de pacientes y permitir una reducción importante de los costos. Este se aplica con éxito en Colombia desde 2012. Hasta el momento, no se ha reportado su utilización en reproducción animal.

El cultivo intravaginal de embriones utiliza un dispositivo que tiene la forma de una cápsula como recipiente, donde los presuntos cigotos son introducidos e incubados hasta por tres días en la vagina de la mujer (Hilario et al., 2014). El dispositivo INVO se compone de dos partes: la primera, denominada cubierta rígida externa, que consta de una cubierta superior y una inferior; la segunda, una cámara interna. La cubierta rígida es fabricada con polietileno y una banda siliconada que permite al dispositivo realizar el

intercambio de gases entre la vagina y el medio de cultivo necesario para mantener las condiciones de pH para el desarrollo embrionario. La cubierta rígida, protege además de la contaminación ambiental y biológica al cultivo intravaginal de los embriones. Los gametos y embriones son depositados en una cámara interna que está constituida por polipropileno, caucho sin látex y una zona de silicona que a la vez es permeable a los gases (Figura 1).

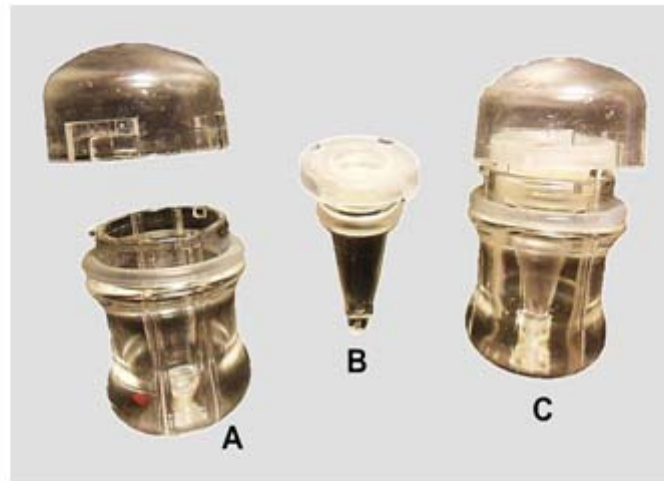


Figura 1. Dispositivo INVO: (A) cubiertas rígidas externas inferior y superior; (B) cámara interna, encargada de contener el medio de cultivo y los presuntos cigotos; (C) dispositivo INVO completo.

La técnica INVO en humanos permite aprovechar las condiciones fisiológicas de la vagina, ya que provee al dispositivo de la temperatura y el CO₂ requerido para el desarrollo óptimo del embrión (Navarro et al., 2012; Frydman & Ranoux, 2008). El diseño del dispositivo INVO permite maximizar la transferencia de CO₂ intravaginal a través de las juntas tóricas de la cubierta rígida externa y la cámara interna, reduciendo la cantidad de transferencia de O₂ al medio; al igual que mantiene el pH adecuado durante la incubación (Ranoux, 2012).

La producción de embriones *in vitro* en bovinos es una técnica en la que los oocitos madurados son fertilizados y los presuntos cigotos son cultivados hasta el estado de mórula o blastocito; lo cual requiere condiciones y equipos de laboratorio que lo hacen costoso (Herradon et al., 2007; Gonella-Daza et al., 2013). Por ello es importante buscar alternativas más económicas y accequibles. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso del dispositivo INVO para la producción de embriones bovinos, utilizando las especificaciones de cultivo diseñadas para la especie humana.

Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, durante el año 2014. Para la incubación vaginal se utilizaron tres bovinos de raza Normando, no gestantes y clínicamente sanas. Para asegurar que los INVO permanecieran en la vagina de los animales se utilizaron dispositivos intravaginales (DIV) usados previamente.

Introducción del INVO en la vagina: se insertaron en la vagina los DIV esterilizados previamente en autoclave. La fijación de la cápsula externa del INVO al dispositivo se realizó con nylon quirúrgico previamente desinfectado con alcohol al 70 %.

Desinfección de la zona perineal: Previa inserción del DIV con el INVO, se desinfectó el periné de los animales con jabón líquido y abundante agua, seguido de una aplicación de yodo al 2%. diluido en agua Para la remoción solo se realizó el lavado de la zona perineal con agua y jabón.

Introducción de los dispositivos: la introducción del DIV se realizó mediante el uso de dos vaginoscopios de diferente diámetro; el DIV con el INVO fue introducido en el de mayor diámetro, posteriormente fue introducido el de menor diámetro. El conjunto de vaginoscopios lubricados con gel estéril fue introducido en la vagina. El de menor diámetro fue utilizado para empujar el dispositivo intravaginal acoplado al INVO, hacia el fondo de la vagina, posteriormente los dos fueron retirados. Se realizó un registro diario de la permanencia del dispositivo en la vagina.

Obtención de oocitos: los oocitos fueron colectados de ovarios provenientes de plantas de beneficio localizadas dentro de la misma ciudad. Los procedimientos de colección de oocitos, identificación, maduración y fertilización, se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio. Para el experimento se utilizaron oocitos clasificados como grado I y II, madurados en una incubadora de CO₂ al 5 % durante 24 horas en medio TCM199 suplementado (suero de yegua en estro, FSH, LH) y posteriormente fertilizados con espermatozoides móviles congelados/descongelados, preseleccionados mediante la técnica de gradientes de Percoll, a una concentración de 1x10⁶ spz/ml en medio Fert-TALP. Dieciocho horas después de la co-incubación se removieron las células de cumulus y los presuntos cigotos se lavaron en medio SOF-modificado, suplementado con 5 % de suero de yegua en estro para su posterior cultivo en el dispositivo INVO.

Montaje del INVO para cultivo intravaginal: con el objetivo de evitar el choque térmico en los embriones, el dispositivo fue precalentado durante 20 minutos a 37 °C. La cámara interna se llenó con 1,0 ml de medio de cultivo SOF-modificado, evitando la

presencia de aire. Los presuntos cigotos (en grupos máximo de 15) fueron introducidos en el fondo de la cámara interna del INVO con ayuda de una micropipeta de 100 µl; posteriormente, se introdujo en la cubierta externa previamente fijada al dispositivo intravaginal (DIV) por medio de sutura con nylon. El DIV conteniendo el dispositivo INVO con los presuntos cigotos fue introducido en la vagina de cada uno de los animales seleccionados. Un número igual de oocitos sin fertilizar fue introducido en otro dispositivo INVO, cultivado en la vagina de la misma manera para ser usado como control de partenogénesis. Adicionalmente, se utilizó un segundo control, un grupo de presuntos cigotos fue colocado en microgotas de 100 µl en una incubadora de CO₂ a 38,2 °C por tres días para comparar las tasas de desarrollo en este período de tiempo. Igualmente se cultivó un grupo de oocitos madurados del mismo modo que el grupo INVO, los cuales no fueron fertilizados para determinar el porcentaje de partenogénesis *in vitro*.

Remoción del dispositivo INVO: el dispositivo fue removido a las 72 horas post introducción via vaginal, halando de la cuerda del DIV; se registró el tipo de secreción vaginal que presentaba cada animal ; en caso de presentación de vaginitis se aplicó un antibiótico , a base de cefalexina o kanamicina, para el control de la infección.

Después de ser removido de la vagina, el INVO fue llevado hasta una zona cercana del laboratorio. En este sitio se abrió la cápsula externa del INVO, retirando únicamente la cubierta rígida externa superior para acceder a la cámara interna la cual se llevó al laboratorio; con el fin de disminuir el riesgo de contaminación..

Evaluación del desarrollo de los presuntos cigotos: el medio de cultivo con los presuntos cigotos fue aspirado con una pipeta pasteur previamente esterilizada y transferidos a una caja de Petri de 35 mm para la búsqueda de los embriones. Cuando no se recuperaron todos los presuntos cigotos colocados inicialmente se realizó un segundo lavado sobre las paredes de la cápsula interna del INVO. Se contaron y clasificaron las estructuras obtenidas y se determinó la tasa de recuperación.

Los presuntos cigotos fueron evaluados morfológicamente con la ayuda de un estereomicroscopio para determinar el número de células y la viabilidad de los mismos de acuerdo con los parámetros establecidos por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) (2010).

El análisis de la información obtenida se realizó mediante estadística descriptiva y se realizaron comparación de proporciones usando Graphpad Prism versión 6®.

Resultados y Discusión

Permanencia del dispositivo INVO en la vagina: para verificar si de la misma forma que en los humanos, el INVO permanecía libremente en la vagina de los animales del estudio, inicialmente fueron introducidos seis recipientes de igual tamaño que el dispositivo; los cuales se sujetaron con una cuerda, se pudo observar que el 100 % de ellos se expulsaron durante las primeras seis horas post introducción.

Se pudo evidenciar que no era factible dejar el INVO sin ningún sistema de sujeción y por esta razón se evaluó fijarlo a un dispositivo vaginal de los utilizados para protocolos de sincronización de celos. Una vez estandarizada la técnica de fijación, e introducción del DIV, más el INVO, se introdujeron un total de n=14 INVOs fijados al dispositivo; de los cuales 13 permanecieron en la vagina durante el tiempo de cultivo con un porcentaje de permanencia del 92,9 %.

En el 71,4 % (10/14) de los casos no se presentó ninguna complicación clínica. Se presentó vaginitis mucopurulenta al momento de la extracción del DIV en 4 de los 14 animales (28,6%); de las cuatro vaginitis observadas, tres se presentaron en el mismo animal.

Recuperación de oocitos y clivaje de embriones producidos por método INVO: En este estudio se tuvieron en cuenta 13 repeticiones, en las que se introdujeron dentro de los dispositivos INVO un total de: 172 estructuras, 89 presuntos cigotos y 83 oocitos no fertilizados ([Tabla 1](#)). El porcentaje de recuperación de los presuntos cigotos y de los oocitos no fertilizados fue del 94,4 % (84/89) y del 89,2 % (74/83), respectivamente, el porcentaje general de recuperación de las estructuras fue del 91,9 % (158/172).

Tabla 1. Porcentajes de clivaje de oocitos fertilizados y no fertilizados cultivados por el método del INVO e incubadora.

		Total oocitos	Recuperados n (%)	Clivados n (%) (sobre recuperados)
INVO	Fertilización	89	84 (94,4)	42 (50,0)
	Partenogénesis	83	74 (89,2)	23 (31,1)
Incubadora	Fertilización	109	NA	46 (42,2)
	Partenogénesis	57	NA	31 (54,4)

NA: No Aplica.

La tasa de clivaje para los presuntos cigotos introducidos en el INVO fue del 50 % (42/84), Mientras que el del control de clivaje en la incubadora fue de 42 % (46/109, p<0,05). La tasa de partenogénesis para los oocitos sin fertilizar en el INVO fue del

31,1% (23/87) y el observado en la incubadora fue del 54 % (31/57, $p>0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los oocitos fertilizados por el método INVO frente a los que fueron mantenidos en a incubadora $p>0,05$, aunque si se observaron en la inducción de partenogénesis ($p<0,05$).

El máximo grado de desarrollo de embriones de 8 y 16 células obtenido en el cultivo realizado en la vagina fue del 9,58 % (3/42) y 5,48 % (1/42), respectivamente.

Para evaluar el potencial de desarrollo de los embriones producidos en la vagina utilizaron Diecisiete embriones los cuales fueron cultivados en una incubadora de CO₂ por cuatro días adicionales; obteniendo cuatro blastocitos, uno eclosionado, uno expandido y dos tempranos; alcanzando una tasa de desarrollo para el blastocisto de 23,5 % (4/17). (Figura 2)

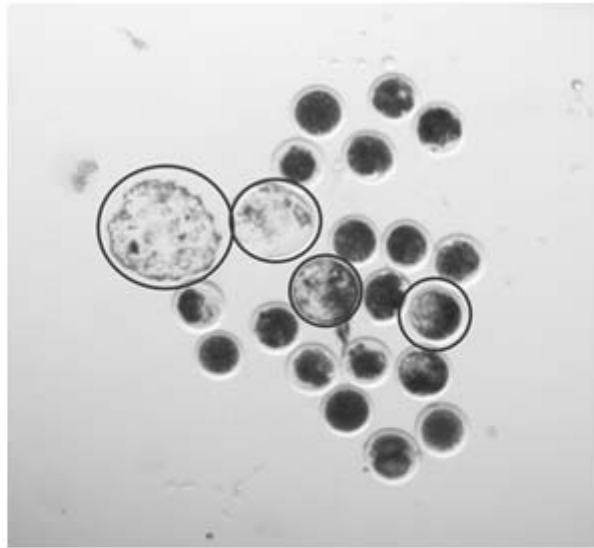


Figura 2. Embriones producidos mediante cultivo intravaginal INVO.
El círculo, denota los embriones producidos mediante cultivo intravaginal temprano.

El presente trabajo reporta por primera vez en la literatura nacional, la obtención de embriones mediante el cultivo en la vagina bovina ; y demostró que es posible alcanzar un desarrollo embrionario hasta el estado de blastocito, momento en el cual podrían ser transferidos a receptoras.

La utilización del dispositivo INVO para la producción de embriones en esta especie requirió del desarrollo y estandarización de diferentes pasos que a la fecha no habían sido reportados en bovinos.. Inicialmente, se aseguró que el INVO permaneciera dentro de la vagina de los animales seleccionados. La importancia de asegurar su permanencia mínima durante tres días significaba proporcionar al embrión, las condiciones ideales para su desarrollo simulando un medio de cultivo. Para lograrlo fue

necesario utilizar el acoplamiento del INVO a un dispositivo intravaginal diseñado para bovinos, ya que como se indicó al inicio del experimento— todos los sistemas INVO que se colocaron sin el dispositivo fueron expulsados rápidamente durante los tres primeros días. Cuando el INVO fue fijado al dispositivo se intravaginal se logró una permanencia del 90 %. Para una mejor colocación del INVO, y del dispositivo intravaginal, es recomendable la utilización de vaginoscopios de diferentes tamaños; con el fin de asegurar la correcta ubicación del dispositivo en la parte más craneal de la vagina.

Se observó secreción mucopurulenta al momento de retirar el INVO en el 28 % (4/14) de los casos; dicha secreción sugiere una reacción inflamatoria por la presencia del dispositivo. Se puede afirmar que este cambio en el medio ambiente de la vagina atribuible a la inflamación, podría tener un efecto importante sobre el adecuado intercambio gaseoso, considerando que a pesar de que se obtuvieron embriones, la tasa de desarrollo fue baja. En el presente se utilizaron vacas en diestro; sin embargo, aunque seguramente éste es el estado más adecuado para el cultivo, por ello, también es importante tener en cuenta que el estado endocrino del animal (estro o diestro) al momento del implante, ya que se puede afectar el cultivo vaginal debido al efecto marcado de las hormonas sobre las características del medio ambiente vaginal y del moco en el bovino.

Se pudo observar que el INVO a nivel de la vagina bovina puede generar una reacción inflamatoria capaz de afectar la viabilidad del cultivo de los embriones en el INVO. Es importante enfatizar en la higiene y en los materiales que se utilizan, buscando la mayor esterilidad posible a la hora del implante. Así mismo, el cultivo intravaginal mediante el método INVO se debe acompañar de planes preventivos ante la posibilidad de presentación de vaginitis severas, el uso de antibióticos puede minimizar el riesgo de infección. Se sugiere, no utilizar las mismas vacas con el fin de permitir la adecuada recuperación de la vagina a las potenciales reacciones que el dispositivo genera.

La tasa de recuperación de estructuras, posterior a la introducción dentro del INVO, fue del 91 % (156/172), es similar a la informada para humanos; mostrando que el uso de INVO en bovinos permite la introducción segura de oocitos o posibles cigotos, sin afectar las tasas de recuperación. Un ligero incremento en las tasas de recuperación se pudo observar luego de realizar el lavado de la cámara posterior a la extracción de los embriones; adicionalmente, se debe considerar la experticia del operario encargado de extraer los embriones.

En el grupo de presuntos cigotos cultivados en condiciones intravaginales, se obtuvo un porcentaje de clivaje del 47 %; mientras que para aquellos cigotos cultivados en condiciones de laboratorio se obtuvo un 42 % de clivaje, no se observaron diferencias entre los grupos ($p > 0,05$); lo cual sugiere la viabilidad del uso del cultivo vaginal como alternativa para el desarrollo de embriones. Estos resultados muestran que el medio ambiente vaginal permite el desarrollo embrionario y que, tal como lo señala Fukuda et

al. (1996) y Guthrie & Welch (2012), la presión de oxígeno (pO₂), la presión del CO₂ (pCO₂) y los niveles de pH a nivel vaginal parecen también ser adecuados para el desarrollo embrionario en bovinos. Con relación a la activación partenogenética de los oocitos, se encontró un porcentaje de clivaje del 28 % en el grupo introducido en INVO; mientras que para los oocitos mantenidos en la incubadora se obtuvo un 54 %; estudios posteriores tendrán que evaluar y explicar estas diferencias. También se debe evaluar el número óptimo de estructuras que pueden ser introducidas en el dispositivo sin afectar su potencial de desarrollo.

Dado que el INVO fue diseñado para obtener embriones humanos mediante el cultivo hasta por 72 horas, basado en estos resultados, habrá que diseñar las estrategias para adecuarlo al sistema de producción de embriones bovinos. Los resultados de este trabajo muestran que los cigotos cultivados por 72 horas mantienen su potencial de desarrollo; por lo tanto, es necesario hacer ajustes relacionados con las diferencias del sistema de producción de embriones *in vitro* que existe hoy en día para bovinos. Se recuerda que en el sistema PIV bovino los oocitos deben ser madurados y fertilizados previamente al cultivo, a diferencia de los humanos que en la mayoría de los casos la maduración se realiza *in vivo*.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que el dispositivo INVO dentro de la vagina bovina unido a un dispositivo vaginal para asegurar su permanencia, permite las condiciones de cultivo necesarias para el desarrollo de cigotos bovinos durante 72 horas y que los embriones obtenidos son capaces de desarrollarse *in vitro* hasta estadios susceptibles de transferencia.

Se hace necesario realizar un mayor número de ensayos para dilucidar las ventajas potenciales que tiene la vagina bovina en el proceso de cultivo de embriones. La presente investigación abre las puertas a una técnica alternativa a los métodos ya establecidos de producción de embriones bovinos; siendo este el primer reporte a nivel mundial que aplica este proceso en el sector pecuario.

Agradecimientos

División de Investigaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, (Código Hermes 20628) al laboratorio de biotecnología reproductiva y a las centrales de faenado Frigorífico Guadalupe y BLE.

Referencias bibliográficas

Batres, F. et al. **Stimulated cycle and intravaginal culture fertilization in an office setting: A preliminary study**. Annual meeting of American Society of Reproductive Medicine. Cincinnati: ASRM, 1997.

Frydman, R.; Ranoux, C. INVO: A simple, low cost effective assisted reproductive technology. **European Society of Human Reproduction Monographs**, v. 1, p. 85-89, 2008.

Fukuda, M.; Fukuda, K.; Ranoux, C. Unexpected low oxygen tension of intravaginal culture. **Hum Reprod.**, v. 6, p. 1293-1295, 1996.

Gonella-Díaz, A. et al. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 65-80, 2013.

Guthrie, H.D.; Welch, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700-1708, 2012.

Herradón, P. et al. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. **Alpa. Org. Vet.**, v. 15, p. 34-41, 2007.

Hilario, R.; Dueñas, J.; González, M. Resultados preliminares de cultivo intravaginal de ovocitos-inyección intracitoplasmática de espermatozoides (INVO-ICSI), en el Centro de Fertilidad Procrear. **Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2014.

Navarro-Carbonell, D.E. et al. Comparación de la calidad embrionaria entre fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo intravaginal de ovocitos (INVO) en el Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad - CECOLFES, Bogotá, Colombia. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 63, n. 3, p. 227-233, 2012.

Ranoux, C. **Advanced Methods and Novel Devices**. In: Nagy, Z.F. et al. (Ed.). Practical Manual of *In vitro* Fertilization. New York: Springer Science, 2012. p. 161-169.

Ranoux, C. et al. A new *in vitro* fertilization technique: Intravaginal culture. **Fert. Steril.**, v. 49, p. 654-57, 1988.

Como citar: Pinzón-Osorio, C.A.; Acosta-Galindez, P.; Cristancho-Mendoza, R.; Vélez-Jaramillo, c.; Pinzón-Porras, J.; Berdugo-Gutiérrez, J.; Zambrano-Varón, J.; Jiménez-Escobar, C. Uso de la vagina como alternativa para la producción de embriones de bovinos. **Revista Veterinaria y Zootecnia**, v. 9, n. 2, p. 54-64, 2015. DOI: 10.17151/vetzo.2015.9.2.5

Esta obra está bajo una [Licencia de Creative Commons Reconocimiento CC BY](#)

