



Evaluación de embriones bovinos cultivados en un dispositivo intravaginal

Evaluation of bovine embryos cultured in an intravaginal device

Helena Navarro Quevedo *, Ingrid Avila Pérez *, José Miguel Sánchez Pellitero *, Luis Enrique Dihigo Cuttis *

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

Recibido: Febrero, 2025; Aceptado: Febrero, 2025; Publicado: Marzo, 2025.

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) involucra las etapas de maduración, fertilización y cultivo. Esta última implica el desarrollo de los presuntos cigotos hasta los estadios de mórulas y blastocitos en condiciones que asemejen a las *in vivo*. Es común que, durante el cultivo, un porcentaje de las estructuras obtenidas experimenten un cese o bloqueo del desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 2023).

Entre los factores que influyen en el bloqueo embrionario se encuentra el estrés producido por el ambiente al cual están sometidos los embriones, como son temperatura, humedad, pH, concentración de gases, entre otros (Hurtado, 2021). Por tanto, se han recurrido a técnicas que puedan simular el ambiente y los procesos que ocurren en el tracto reproductivo de la hembra. Una de ellas es el cultivo intravaginal de embriones mediante la implementación de un dispositivo, que introducido en la vagina genera las condiciones de temperatura, humedad y concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono necesarias para el desarrollo del embrión (Ranoux, 2012).

Este sistema fue utilizado inicialmente en humanos y no existen informes de su aplicación en la PIVE en bovinos hasta el año 2015, donde Pinzón *et al.* (2015) realizaron una investigación que demostró la factibilidad del sistema para la producción de embriones bovinos de 8 y 16 células, con la capacidad de continuar su posterior desarrollo.

Como citar (APA) Navarro Quevedo, H., Avila Pérez, I., Sánchez Pellitero, J.M., & Dihigo Cuttis, L.E. (2025). Evaluación de embriones bovinos cultivados en un dispositivo intravaginal. *Revista De Producción Animal*, 37. <https://apm.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e166>



©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.

Otro de los beneficios que ofrece la utilización de este dispositivo es la reducción de los costos ya que disminuye las tarifas de incubación y monitoreo de laboratorio durante la etapa del cultivo. Además, a diferencia del cultivo *in vivo* en oviductos, no necesita de métodos quirúrgicos ni del sacrificio del animal. Por lo que, el objetivo de este estudio preliminar fue evaluar la obtención de embriones bovinos cultivados en un prototipo de dispositivo intravaginal cubano.

DESARROLLO

Se utilizaron hembras vacunas mestizas-cebú, con una condición corporal (CC) promedio de 2.5 en la escala de 5 puntos para ganado de leche. Los animales se sacrificaron mediante choque eléctrico y desangrado por yugulación en la loza sanitaria ubicada en Nueva Paz, provincia de Mayabeque. Se recuperaron los ovarios directamente de cada animal en un tiempo promedio de 20 minutos posteriores al sacrificio. Se colectaron 36 ovarios y se colocaron en un litro de solución de transporte [Solución buffer fosfatada (PBS) + 0,1mg/mL Kanamicina (SIGMA, K1377-25G)] a 36.5-38.5°C para su traslado al laboratorio en un tiempo de 2 horas posteriores a la colecta.

Los ovarios se procesaron en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida del Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal en la Ganadería Tropical (CIMAGT). Se realizaron tres lavados con solución de transporte y se procedió a la aspiración folicular con bomba de aspiración (Minitube, 23362/0000), con aguja corta de 18G y una presión que correspondiera a un goteo de 20 gotas por minuto. Se aspiraron los folículos de un diámetro entre dos y seis milímetros, y los complejos cúmulo-ovocitos (CCOs) resultantes se depositaron en viales de 50 mL, previamente cargados con cinco mililitros de medio de aspiración [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.

Los CCOs y el líquido folicular contenidos en los viales se diluyeron en medio de recolección [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 siguiendo la metodología descrita por De Loos *et al.* (1989) para las características de la membrana, el citoplasma y el cúmulo apreciables al estereomicroscopio.

Los CCOs aptos para la maduración (categoría 1 y 2) se lavaron cinco veces en placas Petri de 35 mm (Nunc, 174943) con medio de recolección. Se distribuyó el mismo número de ovocitos calidad 1 y 2, en dos grupos. El proceso de maduración se realizó en BO-IVM (IVF Bioscience, 71002), 500 µL de medio 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 empleó pajuelas de semen congelado de un semental Holstein. La separación espermática se realizó con medio comercial BO-SemPrep (IVF Bioscience, 71003). Posteriormente se evaluó la motilidad y conteo espermático en cámara Bürker (Marienfeld-Superior, PM-0610230), ambos pasos 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 2x10⁶ 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. Los presuntos cigotos obtenidos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos.

El grupo control consistió en 500 µL de medio de cultivo BO-IVC (IVF Bioscience, 71005) en placa de cuatro pozos, la cual fue colocada en incubadora de CO₂ a 38,5°C, 5% de CO₂ y en condiciones de máxima humedad. El grupo tratamiento consistió en 500 µL de medio de cultivo BO-IVC (IVF Bioscience, 71005) en un criovial de un mililitro, colocado dentro de un prototipo de dispositivo intravaginal cubano. Este se colocó en la vagina de una hembra vacuna no gestante, acoplado a un sistema de sujeción. A los cinco días, se evaluó el estadio.

Los datos se procesaron y graficaron en el Microsof 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.

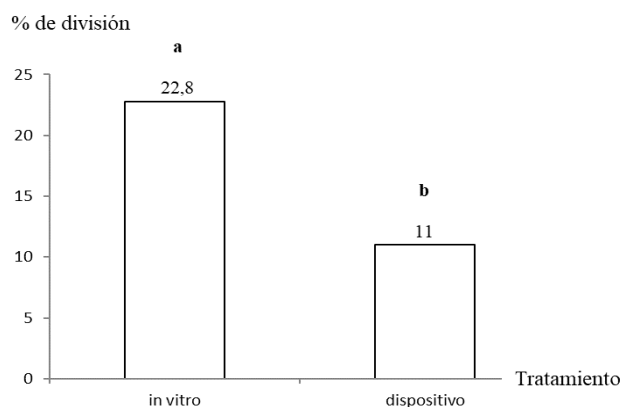


Figura 1: Porcentaje de cigotos bovinos obtenidos por cultivo *in vitro* y mediante la utilización del dispositivo intravaginal INVO-CIMAGT. n=95. Comparación de proporciones (*P<0,05, gl=1).

El animal en el cual se empleó el dispositivo no presentó ninguna reacción a la aplicación de este. Se recuperó un 77% de las estructuras depositadas en el criovial debido a la pérdida en el proceso. Mientras que, en la placa de cuatro pozos se recuperaron todas las estructuras. Valores inferiores a los obtenidos por Pinzón *et al.* (2015), quienes obtuvieron valores superiores de recuperación de un 94%.

En cuanto al porcentaje de cigotos obtenidos, se alcanzó una menor tasa de división en aquellos cultivados en el dispositivo intravaginal (Fig.1). Esto puede a que la técnica aún debe perfeccionarse. Esto resultados difieren con los planteados por Pinzón *et al.* (2015), quienes alcanzaron tasas de clivaje semejantes a las que obtuvieron *in vitro*.

Estos autores demostraron la obtención de embriones bovinos mediante el cultivo con un dispositivo intravaginal, sin embargo, detuvieron el experimento a las 72h de cultivo. Mientras que, el estudio preliminar realizado con un prototipo de dispositivo intravaginal cubano, se llevó el desarrollo de los embriones hasta estadios de mórula y blastocisto; ya que las estructuras que se desarrollan hasta estos estadios son las recomendadas internacionalmente para la crioconservación y posterior transferencia en esta especie.

CONCLUSIONES

En este estudio preliminar, se obtuvieron por primera vez en Cuba embriones bovinos utilizando esta técnica. Demostrando que es posible alcanzar un desarrollo embrionario hasta estadios transferibles con un prototipo de dispositivo intravaginal cubano. Este aún debe perfeccionarse para disminuir la pérdida de estructuras en el proceso y obtener tasas de clivaje semejantes al cultivo *in vitro*.

REFERENCIAS

- De Loos, F., Van, C., Van, P., & Kruip, T. A. M. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 24(2), 197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- Hurtado, M. V. (2021). Bloqueo embrionario ¿en qué consiste? España. Recuperado en 29 de enero de 2025 de: www.victoriainvitro.com/bloqueo-embrionario-en-que-consiste
- Pinzón, C. A., Acosta, P., Cristancho, R., Vélez, C., Pinzón, J., Zambrano, J., Jiménez, C. & Jiménez, C. (2015). Uso de la vagina como alternativa para la producción de embriones de bovinos. *Veterinaria y Zootecnia*, 9(2), 54-64. <https://www.researchgate.net/publication/308937560>
- Ranoux C. *In vivo* embryo culture device. Z.P. Nagy *et al.* (eds.), Practical manual of *in vitro* fertilization: Advanced methods and novel devices, Springer Science, Luxemburgo. 2012, p.161-169. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1780-5>

Zhang, J., Lyu, Q., Li, J., Ma, Z., Yang, R., Yin, X., Yang, L., & Gao, S. (2023). Dissecting the molecular features of bovine-arrested eight-cell embryos using single-cell multi-omics sequencing. *Biology of Reproduction*, 108(6), 871-886.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioad038>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

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

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.