

EVALUACIÓN DE DISPOSITIVOS DE RECOGIDA DE FLUIDO UTERINO EN MODELO OVINO MEDIANTE UN ABORDAJE MÍNIMAMENTE INVASIVO

Poveda, I., Canha¹, A., de la Cruz², J., Morcillo², E., López Albors, O., Soria², F., Sánchez-Margallo², F.M., y Latorre, R*.

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria
30071 Campus Espinardo, "Campus Mare Nostrum". IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biomédica). Universidad de Murcia. Murcia. España. *latorre@um.es

² Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón. Cáceres

INTRODUCCIÓN

La creciente concienciación de la comunidad científica sobre la necesidad de mejorar los medios de cultivos en las técnicas de reproducción asistida, ha favorecido el desarrollo de estrategias de adición de fluidos reproductivos naturales, con el objetivo de mimetizar el ambiente en el que se desarrollan los embriones *in vivo* (Coy et al., 2012). En las especies de producción ganadera se ha demostrado que la incubación previa de ovocitos porcinos con fluido oviductal recolectado, aporta mejoras en la eficacia de la fecundación *in vitro* (Ballester et al., 2014). Además, los blastocitos producidos *in vitro* con fluidos reproductivos naturales, presentan mejor calidad y capacidad de eclosión que los embriones producidos *in vitro* sin la incorporación de estos fluidos (Canovas et al., 2017). Consecuentemente, se deben optimizar estrategias de recolección eficiente de fluido uterino y oviductal en animales vivos. En el caso de la especie ovina, la canulación fija del oviducto mediante laparotomía ha permitido la valoración y caracterización del fluido oviductal (Black et al. 1963) (Aguilar et al. 2005). Sin embargo, esta es una técnica invasiva que requiere de una intervención quirúrgica y anestesia general (Slavik et al. 2005), por lo que es necesario ampliar los estudios enfocados en abordajes mínimamente invasivos.

Este trabajo tiene dos objetivos: el primero, realizar un estudio morfométrico de los aparatos genitales de la especie ovina en las distintas fases del ciclo estral, y el segundo, valorar distintos dispositivos para la recogida de fluido uterino *in-vitro* e *in-vivo*, en aparatos reproductores de oveja. La recogida de fluido uterino y caracterización de la morfología del aparato reproductor de la oveja, servirá para validar esta especie como modelo animal para posteriores evaluaciones de dispositivos de recogida de fluido uterino en la especie humana, lo que contribuirá a la posible incorporación de fluidos naturales en las técnicas de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo experimental se desarrolló en dos fases: una *ex vivo*, y otra *in vivo*. En la primera se utilizaron 102 tractos genitales de ovejas, en diferentes fases del ciclo estral, provenientes del matadero Murgaca S.A de Cartagena. Se caracterizó la morfología de 67 aparatos reproductores, y sus variaciones en función de la fase del ciclo estral. Así, se evaluaron las longitudes y diámetros de las distintas partes del tracto reproductivo, y a continuación se recogió fluido de 44 úteros con tres dispositivos comúnmente utilizados en ginecología humana: Hisopo Dryswab tm Flock, Catéter de transferencia embrionaria Kitazato y Catéter de Biopsia endometrial Pipelle de Cornier.

Posteriormente se ejecutó una fase experimental *in vivo* en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, aprobada por el Comité de ética de Experimentación animal CCMIJU (ref:007/16) y por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Junta de Extremadura (expediente Nº: 20160322-1). 9 ovejas adultas de raza Merina fueron sometidas a sincronización ovulatoria. Mediante técnicas endoscópicas (Cistoscopia Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, óptica Hopkins de 2,7 mm de diámetro y vaina para cistoscopia de 14,5 Charr), control por fluoroscopia y laparoscopia (Karl Storz óptica tipo Hopkins de 0º, 10mm), se logró recorrer el canal cervical y acceder a la luz uterina en siete de las ovejas estudiadas. El fluido uterino fue recogido por sistemas de aspiración mecánica (Aspirator 3 Labotec) y jeringa, asociados al catéter ET Kitazato, y otros dos catéteres de similares características: catéter de acceso renal Cobra de Cook Medical (Limerick, Ireland) y catéter medidor centimetrado de extremo recto de Cook Medical (Cook Group, Indiana, USA). El control mediante laparoscopia se realizó con una doble finalidad. Primero, valorar el estado del ovario, y después, para descartar posibles lesiones durante el recorrido por el cérvix, así como durante la aspiración de fluido uterino. Para separar la fracción celular del

fluido uterino tanto *in vivo* como *ex vivo* se centrifugaron las muestras a 7000g durante 10 min a 4°C, se cuantificó el volumen final de fluido y se almacenó a -80°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos relativos a la morfometría del aparato reproductor se presentan en la Tabla 1. Los valores medios máximos de longitud cervical se presentaron en la fase folicular temprana ($8,49 \pm 1,34$ cm), mientras que los mínimos pertenecieron a la fase luteal media ($7,0 \pm 1,60$ cm). En la anchura del cuerpo uterino, el valor medio más elevado también correspondió con la fase folicular temprana ($2,18 \pm 0,28$ cm), y los valores mínimos con las fases luteal media y tardía ($1,86 \pm 0,25$ y $1,81 \pm 0,29$ cm, respectivamente).

Tabla 1: Resultados morfométricos (cm) en función de la fase del ciclo estral: folicular temprana (A1), folicular tardía (A2), ovulación reciente (A2-A3), luteal media (A3) y luteal tardía (A4).

FASE DEL CICLO	LONGITUD VAGINAL	LONGITUD CERVICAL	L CUERPO UTERINO	L1 CUERNOS UTERINOS	L2 CUERNOS UTERINOS	L TOTAL CUERNO	ANCHURA CUERPO
A1	11,512±2,19	8,493±1,34*	1,285±0,40	8,096±1,45	5,67±1,25	13,756±1,91	2,1889±0,28*
A2	10,813±1,71	7,86±1,33	2,02±2,54	7,627±1,26	6,42±1,42	14,047±2,15	1,9±0,28
A2-A3	11,857±2,19	7,286±0,99	1,843±0,71	8,543±0,82	5,971±1,20	14,514±1,47	1,8429±0,07
A3	10,483±1,73	7±1,60*	1,775±0,78	8,025±0,71	5,817±1,18	13,842±1,48	1,8625±0,25*
A4	11,5±2,54	7,467±1,17	1,65±0,45	8,083±1,31	6,25±1,57	14,333±2,50	1,8167±0,29
Media	11,202±2,03	7,866±1,43	1,628±1,30	8,024±1,23	5,948±1,30	13,967±1,88	1,9284±0,28

* para la misma columna, los valores son significativamente distintos para $p \leq 0.05$.

Tabla 2. Volumen de fluido uterino (μ l) según el dispositivo y la fase de recogida.

Dispositivo	Preovulación	Postovulación
HISOPO Dryswab	6,4±6,02	2,775±3,94
Catéter ET itazato	48,329±84,96	27,25±24,75
Pipelle de Cornier	147,171±101,60	69,857±37,22

Comparando el volumen de fluido uterino recogido *in vitro* por cada uno de los dispositivos (Tabla 2), se concluye que el catéter Pipelle de Cornier fue el que logro recoger más fluido. Fue posible observar que los valores más elevados de fluido recogido correspondieron a la fase preovulatoria. Esta misma tendencia coincide con la observada en la especie humana por Casslen *et al.* (1986). En otro estudio, se observó que los mayores volúmenes de fluido uterino se asociaron al efecto del estradiol, mientras que su reducción, al de progesterona (Salleh *et al.* 2005). Estos autores sugieren que existe una absorción de fluido en el momento del cierre cervical, tras el desarrollo del blastocisto y su llegada a útero, lo que podría explicar los menores valores morfométricos observados a nivel de cuerpo y cuello uterino del modelo animal en la fase A3.

En cuanto a los experimentos *in vivo* (Tabla 3), 5 de las 9 ovejas empleadas no llegaron a ovular, a pesar del tratamiento hormonal administrado, y en dos de estos animales no se consiguió atravesar la luz uterina debido a la falta de dilatación cervical. En las hembras en las que se alcanzó la luz uterina se observaron diferencias de volumen obtenidos a partir de cada cuerno uterino, siendo en el caso de las que presentaban ovulación, mayor el volumen obtenido del cuerno ipsilateral al ovario con reciente ovulación. El sistema de aspiración mecánica mediante bomba, consiguió mayores volúmenes que la aspiración manual con jeringuilla, aunque generó erosiones leves sobre la mucosa uterina. Por otro lado, el control visual por endoscopia durante la aspiración del fluido uterino, permite direccionar el catéter y a su vez, la exploración del lumen uterino antes y después de la aspiración de fluido. Estas ventajas aportadas por el sistema de aspiración y la visualización endoscópica, podrían optimizar la recogida de fluido uterino en la especie humana, reduciendo el tiempo y aumentando el volumen recogido.

A pesar de que la oveja es un modelo animal adecuado para la mayoría de intervenciones ginecológicas, la longitud del cérvix y la disposición de los pliegues cervicales, limitan en

gran medida su empleo como modelo experimental para el abordaje del lumen uterino, requiriendo el uso de endoscopia incluso en aquellos animales en fase de estro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, J., Reyley, M. Anim Reprod. 2005;2(2):91-105
- Ballester, L., Romero-Aguirregomezcorta, J., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., Romar, R., Coy, P. Fertil Steril. 2014;102(6):1762-8.e1
- Black, D.L., Duby, R.T., Riesen, J. J Reprod Fertil. 1963;6:257-60
- Canovas, S., Ivanova, E., Romar, R., García-Martínez, S., Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F. A., Saadeh, H., Andrews, S., Kelsey, G., Coy, P. eLife 2017;10.7554/eLife.23670
- Caslén B. J Reprod Med. 1986;31(6):506-10
- Coy, P., Rev Asoc Est Biol Rep. 2012;17(1):44-52
- Salleh N, Baines DL, Naftalin RJ, Milligan SR. J Membr Biol. 2005;206(1):17-28
- Slavik, T., Dolezel, R. Fulka J. Vet Met. 2005;45(6):153-8
- Slavik, T., Dolezel, R. Fulka J. Vet Met. 2005;45(6):153-8

Agradecimientos: trabajo financiado por H2020 MSC-ITN- EJD 675526 REP-BIOTECH

Tabla 3. Datos recogidos durante la fase in vivo. Ident: Identificación de los animales (S16); D ovario derecho; el ovario izquierdo; C.M.C: Catéter medidor centimetrado; C.C: Catéter Cobra; Asp3: Aspirator 3 Labotec; C. ET: Catéter ET Kitazato.

Oveja (Ident)	Peso (Kg)	Ovarios (D/I) ovulación	Luz uterino	Dispositivo recogida	Volumen total (µl)	Volumen por cuernos(µl)
1 (193)	60	D	Sí	C.M.C	533,4	441,2/92,2
2 (184)	45	D/I	Sí	C.M.C + C.C	397,3	274,1/123,2
3 (180)	47,5	I	Sí	C.C + Asp3	87,7	87,7
4 (175)	50	-	-	-	-	-
5 (176)	45	-	-	-	-	-
6 (177)	48	D	Sí	C.C + Aps3	314,4	210/104,4
7 (194)	58	-	Sí	C. C, C. ET + Asp3	465	365/100
8 (178)	48	-	Sí	C. ET + Asp3	322	174/148
9 (185)	61	D	Sí	C. ET + Asp3	53	53

EVALUATION OF UTERINE FLUID COLLECTION DEVICES IN SHEEP MODEL BY MINIMALLY INVASIVE PROCEDURES

ABSTRACT: Culture media supplemented with natural female reproductive fluids have improved in vitro fertilization efficiency in several species and have produced in vitro porcine embryos with an epigenetic profile closer to the ones generated in vivo. Moreover, with these fluids, the obtained blastocysts have a greater number of cells and hatchability than those produced with synthetic serum albumin as a protein source. This has encouraged the development of devices that allow a noninvasive uterine fluid collection. This study was focused on a morphometric characterization of 102 sheep genital tracts at different stages of the estrous cycle and an evaluation of the efficacy of different human gynecology devices to collect uterine fluid. The ET Kitazato and Cobra catheters were suitable devices for obtaining uterine fluid in vivo and mechanical aspiration and endoscopic control can optimize the collection of uterine fluid by reducing time, increasing volume and security. The Pipelle Cornier catheter showed the best performance regarding the volume of uterine fluid collected. The length of the cervix and the cervical folds of sheep restrict the use of this species as an experimental model for human uterine lumen approach.

Keywords: uterine fluid, collection devices, genital tract.