

ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE COCULTIVO DE EMBRIONES OVINOS EN ESTADIOS TEMPRANOS

R.M. García-García; A. González-Bulnes; V. Domínguez; J. Santiago Moreno;
A. del Campo; M.J. Cocero

*Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos.
SGIT/INIA. Avda Puerta de Hierro km 5,9. 28040- Madrid*

INTRODUCCIÓN

El desarrollo in vitro de embriones de rumiantes en estadios de mórula compactada y blastocisto, se consigue en medios de cultivo definidos con índices de rendimiento elevados; sin embargo, las etapas más iniciales del periodo de división, requieren condiciones especiales para superar el denominado "bloqueo" que se produce al alcanzar la fase de 8-16 células (Wright y Bondioli, 1981). Uno de los procedimientos más utilizados consiste en el cocultivo con distintos tipos de células somáticas (revisado por Rexroad, 1989), siendo las células epiteliales oviductales las primeras que se utilizaron con éxito (Gandolfi y Moor, 1987). Esta técnica presenta como inconvenientes la laboriosidad y falta de homogeneidad en las distintas repeticiones del cultivo embrionario; la disponibilidad de un stock constante de células simplifica y homogeiniza el sistema a lo largo de los distintos periodos de trabajo. El objetivo de este estudio fue estandarizar el sistema de cultivo celular, mediante la evaluación del efecto en el desarrollo in vitro de embriones ovinos en estadios iniciales, del tiempo de establecimiento de la monocapa y de la congelación de las células somáticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Establecimiento de monocapas de células frescas

Las células de oviducto se obtuvieron a partir del legrado de dos tramos de oviducto (uno cercano a la ampolla y el otro cercano al istmo). Tras su homogeneización y centrifugación, se determinó la concentración de células mediante tinción diferencial con azul tripán. Posteriormente, se ajustó dicha concentración a 500.000 céls/ml, en medio base de cultivo (M199+ 1% antibiótico - antimicótico + 1% L-glutamina + 10 % SFB) . Se sembraron 500 μ l/pocillo de la suspensión en placas de 4 pocillos y fueron incubadas en estufa con 5% CO₂ y 90% de humedad, a 38.5°C.

b) Congelación de células oviductales

Las células congeladas se aislaron mediante el procedimiento anteriormente descrito. Se calculó la concentración celular, resuspendiendo el pellet con M199 + 10% de DMSO como crioprotector, hasta obtener una concentración aproximada de 1×10^6 céls/ml. Posteriormente, fueron introducidas en criotubos de 1ml y congeladas a -70°C durante 24 horas, tras las cuales se almacenaron en Nitrógeno líquido hasta su utilización. Las monocapas de células congeladas se elaboraron con el mismo procedimiento descrito para las monocapas frescas.

c) Cocultivo de embriones

Los embriones fueron obtenidos por lavado quirúrgico en el oviducto (Ramón y col., 1991), de hembras sincronizadas y superovuladas con FSH ovina (Cocero y

col. 1999). Tras su valoración morfológica, fueron distribuidos en grupos según el estadio (2 a 4 células, 4 a 8 células, 8 a 12 células) e introducidos en monocapas de células frescas sembradas 48 horas, 4 días o 5 días antes del inicio del cocultivo. Adicionalmente, embriones de los mismos estadios fueron cocultivados con monocapas de células congeladas–descongeladas, sembradas 48 horas antes. Se evaluó el desarrollo de los embriones cada 24 horas, hasta la llegada a blastocisto, utilizando un microscopio de contraste interdiferencial de Hoffmann. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas.

d) Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Efecto de la edad de la monocapa

El análisis de los datos no indicó un efecto significativo de la edad de la monocapa en el desarrollo de los embriones cocultivados en monocapas frescas (Tabla I). Esta falta de efecto de la edad de la monocapa, sobre el desarrollo in vitro de los embriones ovinos, coincide con la no influencia del uso de células en suspensión o en monocapas confluentes al 70-80% observado en embriones bovinos de 1 a 4 células (McCaffrey y col., 1991). Cuando se evaluó el posible efecto del estadio del embrión al inicio del cultivo, se observó una tendencia a un mejor desarrollo a blastocisto de los embriones que se obtuvieron en fases más avanzadas del ciclo de división ($p=0.05$); este efecto también se produce cuando se utiliza un medio de cultivo definido (Thompson y col., 1989), pero los índices de desarrollo in vitro obtenidos en nuestro sistema son muy superiores a los notificados por dichos autores e incluso mayores que la media de blastocistos que se obtienen en medios semidefinidos, en resultados más actuales (Bavister, 2000).

Tabla I. Porcentajes de desarrollo in vitro de embriones cocultivados en monocapas de células frescas de distintas edades.

	Embr 2-4 cel (n)	Embr 4-8 cel (n)	Emb 8-12 cel (n)	Total (n)
Mcpa 48 h	64,2±16,8 (17)	73,3 ±19,4 (19)	100±0,0 (15)	75,9±10,0 (51)
Mcpa 4d	60,4±16,0 (22)	71,1 ± 16,0 (17)	100±0,0 (20)	74,2 ± 8,9 (59)
Mcpa 5d	74,2±19,4 (17)	82,6 ± 12,9 (18)	85,9± 6,4 (18)	80,9±7,6 (53)
Total	65,3 ± 9,6 (56)	75,4 ± 8,9 (54)	94,6 ± 3,0 (53)	76,8±5,1 (161)

b) Efecto de la congelación en la eficacia del cocultivo

Puesto que no se observaron diferencias en el desarrollo relacionadas con la edad de la monocapa, para la homogeneización del sistema se eligieron monocapas de células congeladas -descongeladas sembradas 48 horas antes del inicio del cultivo, pues el impacto más favorable de las células somáticas se produciría durante las divisiones rápidas de las mismas (Wiemer y col., 1998). El análisis de los resultados no señaló diferencias significativas entre los porcentajes de blastocistos obtenidos en monocapas frescas y congeladas, encontrándose de nuevo una tendencia positiva ($p=0.06$) a un mejor desarrollo en los embriones de 8-12 células. Hoshi y col. (1994) tampoco encontraron una diferencia significativa en el efecto beneficioso del cocultivo de embriones de ratón de dos células, entre monocapas establecidas a partir de células frescas y monocapas derivadas de células congeladas, ambas de origen humano. Un estudio previo realizado con un sistema distinto de congelación, a partir de una monocapa ya establecida, tampoco detectó diferencias en el desarrollo embrionario de cigotos ovinos, entre monocapas de células frescas y congeladas (Rexroad y Powell, 1988).

Tabla II. Porcentajes de desarrollo in vitro de embriones cocultivados en monocapas de células congeladas.

	Embr 2-4 cel (n)	Embr 4-8 cel (n)	Emb 8-12 cel (n)	Total (n)
Mcpa 48h	76,5±14,5 (20)	89,6±4,7 (29)	100 ± 0,0 (21)	84,9±7,1 (70)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bavister, B.D..2000. *Theriogenology* 53:619-626.
- Cocero, M.J., González-Bulnes, A., Santiago Moreno, J., García López, M., López Sebastián, A..1999. *ITEA* Vol. Extra 20 : 702-704.
- Gandolfi, F., Moor, R.M.. 1987. *J. Reprod. Fertil.* 81:23-28.
- Hoshi, K., Kanno, Y., Katayose, H., Yanagida, K., Suzuki, R., Sato, A..1994. *J. Assisted Reprod. Genetics* 11(7): 367-372.
- Mc Caffrey, C., Mc Evoy, T.G., Diskin, M.G., Gwazdauskas, F.C., Kane, M.T., Sreenan, J.M..1991. *J. Reprod. Fertil.* 91:119-124.
- Ramón, J., Folch, J., Fdez-Arias, A., Alabart, J.L., Cocero, M.J., Echegoyen, E..1991. *ITEA* vol extra 11:61-63.
- Rexroad, C.E. Jr., Powell, A.M..1988. *Theriogenology* 29: 387-397.
- Rexroad, C.E. Jr..1989. *Theriogenology* 31:105-114.
- Thompson, J.G.E., Parton, G.A.J., Cruickshank, G.W., Smith, J.F., Wales, R.G..1989. *Theriogenology* 32:323-330.
- Wiemer, K.E., Cohen, J., Tucker, M.J., Godke, R.A..1998. *Human Reprod.*, 13 Suppl 4: 226-238.
- Wright, R.W. and Bondioli, K.R.. 1981. *J. of Anim. Sci.* 53:702-729.