EFECTO DE DIVERSOS FACTORES SOBRE LA EFICACIA DE LA ELECTROFUSION DE EMBRIONES DE CONEJO EN ESTADIO DE DOS CELULAS.

García-Ximenez, F.*; Cruz, J.M.**; Pérez, A.**; Escribá, M.J.*

(*) Laboratorio de Reproducción. Dpto. de Ciencia Animal.

(**) Departamento de Física Aplicada.

Universidad Politécnica de Valencia.

INTRODUCCION

La electrofusión celular es hoy día la técnica más utilizada para la clonación de embriones (Smith, 1992). Con vistas a su aplicación en embriones de conejo, actualmente se están definiendo los efectos que distintos factores ejercen sobre la eficacia de la fusión celular, utilizando como modelo embriones de conejo en estadio de dos células.

En un primer trabajo utilizando dicho modelo (García-Ximenez y col., 1995), se estableció que las intensidades de campo eléctrico de 3.6 Kv/cm o de 3.2 Kv/cm eran las más eficaces (aunque con una cierta ventaja no significativa del pulso de 3.6 Kv/cm) siempre que se aplicaran en pulsos de 20x3 µs. En el presente trabajo, se han intentado perfilar más las características del pulso, comparando las dos intensidades de campo antes mencionadas, pero aplicadas en forma de un único pulso de 60 µsegundos o bien fraccionando dicho pulso en tres consecutivos de 20 µs cada uno. Además se ha estudiado el efecto que sobre la tasa de fusión y de supervivencia posterior ejerce el hecho de que los embriones a fusionar sean conservados previamente en un medio tampón fosfato (DPBS) o en un tampón bicarbonato (HAMS'S F10).

MATERIAL Y METODOS

La obtención y preparación de los embriones de dos células, las características del equipo de electrofusión y la técnica de electrofusión, así como el cultivo posterior de los embriones ya se han descrito con detalle (García-Ximenez y col., 1995). Brevemente, los embriones de dos células se recuperan por perfusión oviductal con DPBS + 20% de suero homólogo 25 horas post-coito. Seguidamente son catalogados bajo lupa y lavados dos veces en el medio de conservación (DPBS o HAM'S F10) hasta ser suspendidos en 0.30 M de manitol conteniendo 100 µmoles de cloruro cálcico y 100 µmoles de cloruro magnésico (Collas y Robl, 1991). Inmediatamente después de aplicados los pulsos (3.6 Kv/cm o 3.2 Kv/cm durante 60 µs o durante 20x3 µs) los embriones (175) se lavaron en HAM'S F10 y se cultivaron en 7% de CO_2 en aire y 39ºC hasta al menos tres días. A diferencia del trabajo anterior, no se utilizó CCB antes ni después del pulso.

Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó el test chi-cuadrado con la corrección de Yates.

RESULTADOS Y DISCUSION

Del total de 175 embriones sometidos a electrofusión, tan sólo 2 se lisaron.

No se detectó ningún efecto significativo del medio (DPBS o HAM´S F10) sobre la tasa de fusión. Sin embargo, la conservación en DPBS previa al pulso determina un efecto significativamente desfavorable sobre la supervivencia posterior de los embriones fusionados (DPBS: 78% vs. HAM´S F10: 100%).

En cuanto a la aplicación de un único pulso (60 µs) o su fraccionamiento en tres consecutivos (20x3 µs), se observa que el pulso no fraccionado determina un efecto negativo altamente significativo sobre la tasa de fusión (60 µs: 27% vs. 20x3 µs: 43%). Por contra, no se detectó ningún efecto sobre la tasa de supervivencia de los embriones fusionados.

Las dos intensidades de campo eléctrico ensayadas (3.6 y 3.2 Kv/cm), no suponen efectos diferenciales ni para la tasa de fusión ni para la supervivencia posterior.

La supervivencia (hasta mórula al menos) de los embriones no fusionados, no se vió afectada significativamente por ninguno de los factores estudiados (tasa global: 96%).

TABLA: Efectos del medio de conservación previo a la fusión (DPBS vs. HAM´S F10), del tipo de pulso (20x3 µs vs. 60x1 µs) y de la intensidad de campo eléctrico (3.6 vs. 3.2 Kv/cm) sobre la tasa de fusión (FUS/TOT) y la tasa de fusionados que se desarrollan al menos hasta el estadio de mórula (DES/FUS).

		DPBS				HAM´S F10			
		20x3 µs		60x1 µs		20x3 µs		60x1 µs	
		3.6 Kv/cm	3.2 Kv/cm	3.6 Kv/cm	3.2 Kv/cm	3.6 Kv/cm	3.2 Kv/cm	3.6 Kv/cm	3.2 Kv/cm
FUS/TOT	%	50	35	21	35	46	41	28	29
	N°	9/18	7/20	4/19	7/23	11/24	9/22	7/25	7/2
DES/FUS	%	89	57	75	86	100	100	100	100
	N°	8/9	4/7	3/4	6/7	9/9	7/7	6/6	7/7

REFERENCIAS

Collas, P.; Robl, J.M. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biology Reproduction, 45, 455-465.

García-Ximenez, F.; Cruz, J.M.; Pérez, A. 1995. Fusión celular de embriones de conejo en estadio de dos células. Primeros resultados utilizando un equipo no comercial de electrofusión. I.T.E.A. 90 (3) Producción Animal (en prensa).

Smith, L. Ch. 1992. Production of genetically identical embryos by electrofusion. Guide to electroporation and electrofusion, 371-392. Academic Press. San Diego.