CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES CAPRINOS

D. Izquierdo, P. Villamediana y M.T.Paramio

Departament de Patología i Producció Animals. Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Actualmente se ha conseguido el nacimiento de cabritos a partir de ovocitos madurados (MIV) , fecundados (FIV) y cultivados (CIV) hasta el estadío de blastocisto, en condiciones in vitro (Cognié y col., 1995 y Keskintepe y col., 1996). De estos 3 procesos, necesarios para la producción de embriones in vitro,el menos eficiente es el cultivo de embriones desde el estadío de 2 células hasta blastocisto.

En caprino los medios de cultivo y los resultados obtenidos de desarrollo embrionario in vitro, son variados. Así Crozet y col (1995) cultivan en medio B2 con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y células del epitelio oviductal (CEO) y consiguen 26% de blastocistos. Cognié y col (1995) cultivan en medio SOF sin células, en una atmósfera del 5% de O_2 y consiguen el 31.3%. Keskintepe y col. (1996) utilizan M-199 suplementado con un 10% de SFB y células de la granulosa (CG) y obtienen el 31.8%. En nuestro laboratorio utilizando M-199, suero de cabra en celo (SCC) y células de la granulosa (CG), Mogas y col (1997) consiguen el 8.3% utlizando ovocitos de cabras prepúberes.

En conclusión los distintos laboratorios utilizan distintos medios, disintos tipos celulares y distintos tipos de suero. Así el objetivo de este trabajo es comparar utilizando el M-199 la utilización de distintos tipos celulares (granulosa vs. epitelio oviductal) con la presencia o ausencia de SCC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Maduración in vitro de ovocitos: Los complejos cumulus-ovocitos se obtuvieron mediante slicing de ovarios de cabras prepúberes recogidos en el matadero. La MIV se realizó en microgotas de 50µl de M-199 Hepes suplementado con 10 µg/ml de FSH, 10µg/ml de LH, 1 µg/ml de 17 β estradiol y 20% de SCC. Los ovocitos se cultivaron durante 27 h a 38.5ºC en una atmósfera del 5% de CO_2 en aire saturado de humedad.

Capacitación de los espermatozoides: Los eyaculados frescos de 2 machos se lavaron y seleccionaron mediante swim-up en mDM durante 1 hora. La capacitación se realizó en mDM con 50 μg/ml de heparina durante 45 min a 38.5°C siguiendo el protocolo de Younis y col. (1991).

Fecundación in vitro : Los ovocitos madurados in vitro se colocaron en microgotas de 100 μl de medio TALP suplementado con 1 μg/ml de hipotaurina y se inseminaron con 5 μl de la suspensión de espermatozoides con heparina. Los gametos permanecieron en cocultivo durante 24 horas a 38.5°C en una atmósfera al 5% de CO_2.

Cultivo in vitro : El medio de cultivo utilizado fue el M-199 bicarbonato suplementado con 0.55 mg/ml de piruvato sódico, 0.146 mg/ml L-glutamina, 3.5 mg/ml BSA y 0.05 mg/ml gentamicina.

- Preparación de las monocapas de células de la granulosa: Se recogieron las células de la granulosa liberadas en el medio de lavado de los ovocitos. Se colocaron en microgotas de 100 μl del medio de cultivo suplementado con 10% de SCC . Después de 48 h de cultivo las células formaron una monocapa en las base de las gotas.

- Preparación del cultivo de las células epiteliales del oviducto: Los oviductos de cabras prepúberes fueron transportados al laboratorio en PBS a 4°C. El epitelio oviductal se obtuvo presionando con una pinzas de disección las paredes del oviducto. Las masas de células epiteliales se depositaron en una placa de petri con M199-hepes y se disgregaron aspirándolas y expulsándolas varias veces con una jeringuilla. Estos fragmentos se lavaron por sedimentación en M -199. Finalmente se resuspendieron 50 μg/ml del sedimento en 3 ml de medio de cultivo suplementado con 10% de SCC. A las 24 horas se evaluaron las células al microscopio invertido y se seleccionaron los grupos celulares que presentaban movimiento. Estos fueron lavados para eliminar el suero y se transpasaron a microgotas de 100μl del medio de cultivo, en las cuales se obtuvo un cultivo mixto de células que formaban agregados que nadaban libremente y células adheridas a la base de la gota.

24 horas después de la inseminación, los ovocitos se limpiaron de espermatozoides y células del cúmulus y fueron transferidos a las gotas de cultivo. A las 24 h del inicio del cultivo (48hpi),se examinaron con la lupa para observar los embriones con

2 o 4 células y retirar los ovocitos no fecundados. El cultivo duró 7 días y se llevó a cabo a 38.5°C con 5% de CO_2 en aire y saturado de humedad. Cada 48 h se procedía a la renovación de 50 µl del medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuadro 1. Resultados del cultivo in vitro de embriones caprinos

		Día 8 post-inseminación				
M-199	n°embr.	% >8cels (n°)	% >16 cels (n°)	%Morulas (n°)	%Blastocist (n°)	%M+B (n°)
CEO	238	72.3a (172)	42.9a (102)	13a (31)	10.1a (24)	23.1a (55)
CEO +SCC	203	50.2b (102)	26.1b (53)	8.4a (17)	5.9a (12)	14.3b (29)
CG +SCC	173	32.4c (56)	8.7c (15)	3.5b (6)	0.6b (1)	4.1c (7)
SCC	187	24.6c (46)	9.6c (18)	3.2b (6)	0.5b (1)	3.7c (7)

a,b,c: letras diferentes indican diferencias significativas ($\chi 2$, $p<0.005$)

Los mayores resultados, en porcentajes de mórulas y blastocistos, se obtienen en el medio de cultivo formado con células del epitelio oviductal y sin el suplemento de suero de cabra en celo. La utilización de células de la granulosa parece innecesaria para el desarrollo de los embriones. Estos resultados son todavía son muy inferiores a los conseguidos con ovocitos de cabras adultas o los obtenidos en vacuno.

REFERENCIAS

Cognié y col., 1995 . 11e Réunion A.E.T.E. Hannover, 146

Crozet y col.,1995. Journal Reproduction Fetility,103: 293-298

Keskintepe y col. 1996. Small Ruminant Research, 20: 247-254.

Mogas y col. 1997. Theryogenology (en prensa)

Younis y col. 1991. Biology of Reproduction, 44: 1177-1182