ENCAPSULACION DE EMBRIONES BOVINOS EN MICROCAPSULAS ESFÉRICAS DE ALGINATO

Jesús Yániz[1], Pilar Santolaria[1], Joaquín Surra[1], Manel López-Béjar[2], Josep Rutllant[2], Fernando López-Gatius[3]

[1]Dept. Producción Animal. E.U. Politécnica de Huesca, 22071 Huesca, España.
[2]Dept. Anatomia y Embriologia, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.
[3]Dept de Producción Animal. Universidad de Lleida. 25198 Lleida. España.

INTRODUCCION

La bioencapsulación consiste en la captura de materiales biológicos activos en cápsulas de gel. Las cápsulas resultantes pueden contener encimas, ADN, vacunas, células vivas y otros materiales con actividad biológica o farmacológica. La bioencapsulación tiene aplicaciones en la mayoría de campos relacionados con la biología, tales como la medicina, farmacología, bioquímica, ciencia de los alimentos, agricultura, ganadería, acuicultura, y tecnologías medioambientales.

En relación con las biotecnologías reproductivas, se han encapsulado espermatozoides y embriones con diferentes objetivos. Mediante encapsulación espermática se ha intentado aumentar la permanencia y supervivencia de los espermatozoides en el aparato genital de la hembra (Nebel y col., 1985). Por otro lado, la encapsulación se ha utilizado para proteger a los embriones de los daños de membrana que se producen durante la congelación (Niemann y col., 1983), para proporcionar una membrana artificial a los embriones manipulados (Krent y col., 1993), y para mejorar los resultados de desarrollo in vitro (Elsheikh y col., 1997).

En los trabajos de encapsulación embrionaria, el método de encapsulación incluye la utilización de una pipeta como molde para la formación de cápsulas cilíndricas, que contienen uno o varios embriones. Este método de encapsulación tiene la ventaja de controlar visualmente los embriones durante todo el proceso de encapsulación. Sin embargo, es un método delicado y lento cuando se maneja un gran número de embriones. Además, el tamaño de las cápsulas que se forman está limitado por el calibre de la pipeta utilizada como molde, lo que en ocasiones dificulta el manejo de las cápsulas y puede dificultar la eclosión de los blastocistos al tener que atravesar un mayor grosor de gel.

En la encapsulación de otros tipos celulares se ha utilizado otro método de encapsulación en el que se producen microcápsulas esféricas. El proceso de fabricación no se basa en un molde sino en la formación de microgotas (Nebel y col., 1985). El objetivo de este trabajo es adaptar este método a la encapsulación de embriones con el fin de facilitar el proceso de encapsulación y el manejo de las cápsulas.

MATERIAL Y METODOS

Método de encapsulación.

Se ha adaptado un método de encapsulación utilizado para otros tipos celulares como espermatozoides (Nebel y col., 1985) a la encapsulación de embriones de vaca. Se transfirieron los embriones del medio de cultivo a una solución 0,1 M de alginato de sodio en solución salina fisiológica a 39° C. Se absorbió el contenido en una jeringa de 5 ml. Se produjeron microgotas que contenían embriones mediante el método de extrusión con inyector. El inyector fuerza a la solución a salir a través de un aguja de 22G contenida dentro de una pieza de encapsulación. Simultáneamente, se hace pasar aire a una presión constante a través del interior de la pieza de encapsulación. El flujo de aire se regula mediante un medidor de flujo. El tamaño de las microgotas viene determinado por el calibre del aguja y el flujo de aire. Las microgotas se recogen en un recipiente que contiene una solución 0.1 M de Cl2Ca. Al contactar con el líquido, las microgotas gelifican formando las microcápsulas, conteniendo los embriones en el interior.

Producción in vitro.

Los ovarios se recogieron en un matadero próximo al laboratorio y se aspiraron los folículos de 2-7 mm de diámetro utilizando un aguja de 18G. Se seleccionaron bajo la lupa los ovocitos cuyo cúmulus oophurus estaba compacto e intacto y se lavaron 4 veces en Hepes-TCM 199. Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se maduraron en TCM 199 con sales de Earle, L-glutamina y $NaHCO_3$, incluyendo un 10% de suero fetal bovino y 10 ng ml^{-1} de EGF. La maduración se realizó en una atmósfera humedificada con 5% de CO_2, a 39°C durante 22-26 h.

Los COCs maduros se fecundaron en el medio TALP bajo en bicarbonato (2 mg/ml) de Tyrode, incluyendo 6 mg/ml de albúmina FAF, 4 mg/ml de lactato de sodio, y 0.11 mg/ml de piruvato de sodio con 1.7 UI/ml de sal sódica de heparina. Los espermatozoides mótiles se obtuvieron mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Los espermatozoides se diluyeron hasta obtener una concentración final de 2 x 10^6/ml y se incubaron con los COCs durante 18 h.

Los supuestos cigotos se denudaron mediante agitación y se cultivaron en gotas de 20-µl de Fluido Sintético Oviductal (SOF) modificado de acuerdo con Holm y col.(1997). El cultivo se realizó en una atmósfera de 5% CO_2, 5% O_2 y 90% N_2 durante 2 días. En el día 2 los embriones de excelente calidad se dividiron al azar en dos grupos: encapsulados (n=125) y control (n=126). Treinta embriones, la mitad de ellos encapsulados, se transfirieron a cada gota de cultivo de 30-µl. El cultivo se realizó en una atmósfera modificada de 5% CO_2, 5% O_2 y 90% N_2 a 39°C y se estudió la proporción de blastocistos el d7 y blastoscistos eclosionados el d9 obtenidos en cada grupo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Este método de encapsulación permitió fabricar microcápsulas de 0,2 mm, muy fáciles de manejar con el material habitual de producción in vitro. En el proceso de encapsulación se perdieron 3 embriones. Todas las cápsulas contenían un solo embrión en su interior. Los resultados de desarrollo in vitro y de eclosión fueron semejantes en el grupo de embriones encapsulados y en el grupo control (tabla 1).

Tabla 1: Desarrollo in vitro y eclosión de embriones bovinos encapsulados en microcápsulas esféricas de alginato.

GRUPO	N	Blastocistos d7	Blastocistos eclosionados d9
ENCAPSULADOS	122	68	55
CONTROL	126	59	51

N: nº de embriones de 2 días.

En conclusión, la encapsulación de embriones de vaca en microcápsulas esféricas de alginato es posible, rápida y segura. Este método está especialmente indicado cuando se trabaja con un número elevado de embriones y cuando las condiciones de trabajo exigen manejar cápsulas de pequeño tamaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elsheikh AL, Takahashi Y, Hishinuma M, Nour MSM, Kanagawa H. Effect of encapsulation on development of mouse pronuclear stage embryos in vitro. Anim Reprod Sci 1997; 48:317-324.

2. Holm P, Booth P, Vajta G, Callesen H. A protein-free SOF system supplemented with amino acids, sodium citrate and myo-inositol 1997 Proceedings of the 13th Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Lyon 158.

3. Krentz KJ, Nebel RL, Canseco RS. In vitro and in vivo development of mouse morulae encapsulated in 2% sodium alginate or 0.1% poly-L-lysine. Theriogenology 1993; 39:655-667.

4. Nebel RL, Bame J, Saacke RG. Microencapsulation fo bovine spermatozoa. J. Anim. Sci. 1985; *60*:1631-1639.

5. Niemann H, Illera MJ, Smidt D. In vitro development of pig morulae after enzimatic removal or microsurgical treatment of the zona pellucida. Theriogenology 1983; 19:142 abstr.