EVALUACIÓN DEL CARRAGENATO COMO SUSTRATO PARA LA ENCAPSULACION EMBRIONARIA

Jesús Yániz[1], Pilar Santolaria[1], Manel López-Béjar[2], Josep Rutllant[2], Fernando López-Gatius[3]
[1]Dept. Producción Animal. E.U. Politécnica de Huesca, 22071 Huesca.
[2]Dept. Anatomia y Embriologia, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.
[3]Dept de Producción Animal. Universidad de Lleida. 25198 Lleida.

INTRODUCCION

Una gran parte de la investigación actual sobre encapsulación se dedica al estudio de los polímeros, materiales semejantes a los geles que se utilizan como substrato para la encapsulación de las células. Los polímeros más utilizados en encapsulación se aislan de algas marinas, siendo los más importantes el agar, la agarosa, el alginato y el carragenato.

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 la mayor parte de los estudios de encapsulación embrionaria se ha utilizado el alginato como matriz. Sin embargo, el carragenato posee algunas propiedades que podrían ofrecer mayores ventajas en la encapsulación de ovocitos y embriones. El carragenato es una familia de galactanos sulfatados extraidos de algas rojas marinas. Las diferencias en sulfatación y estructura determinan la existencia de diferentes variedades de carragenato (Michel y col., 1997). Al tratarse de un polisacárido sulfatado, está mucho más próximo a los polisacáridos de las células animales que el alginato. El carragenato solidifica dependiendo de la variedad, concentración, presencia y tipo de sales y temperatura. Una vez formada, la cápsula de carragenato es más estable que la de alginato, y no depende tanto de las condiciones del medio.

Las condiciones de solidificación del carragenato son diferentes que las del alginato. Por ello, los protocolos que utilizan alginato para encapsular embriones no son extrapolables. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de encapsulación de embriones de vaca en k-carragenato y evaluar el desarrollo in vitro de embriones bovinos encapsulados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Método de encapsulación

La encapsulación de embriones en K-carragenato no pudo realizarse con el método clásico de encapsulación embrionaria en alginato, en el que se producen cápsulas cilíndricas, debido a la continua obstrucción de las pipetas. Por ello se optó por la fabricación de cápsulas esféricas.

Una concentración final de 1.5 % de K-carragenato en solución salina fisiológica se consideró de elección para la encapsulación de embriones de vaca, ya que se representa el óptimo entre una baja viscosidad y capacidad de formación de cápsulas en la solución de sales. Para conseguir unas condiciones óptimas del polímero, se calentó el k-carragenato en un baño maría a 70° C durante 15 minutos y se atemperó a 39 ° C. Para prevenir la gelificación del k-carragenato se calentó el material utilizado para encapsular (placas de Petri, jeringas, agujas...) en una estufa a 39°C.

Se transfirieron los embriones del medio de cultivo a una placa de petri de 35 mm que contenía 0.5-1 cc de una solución 0.1 M de K-carragenato a 39° C y se mezcló. Con una jeringa de 5 cc sin aguja se aspiró la solución que contenía los embriones y se acopló a un aguja de insulina de 0,5 mm. Con agujas de mayores diámetros se formaban cápsulas grandes mientras que si se reducían los calibres se dificultaba la eyección. Se colocó la punta de la aguja a 0.5-1 cm sobre la superficie de una solución de KCl 0,1 M. Se empujó el émbolo lentamente para que se formasen gotas que, en contacto con las sales de la solución, gelificaron formando cápsulas de carragenato, algunas de las cuales contenían embriones.

Las cápsulas con embriones se buscaron bajo la lupa y se transfirieron al medio deseado. Este protocolo permite producir cápsulas esféricas entre 0,75 y 1 mm de diámetro. La desencapsulación puede hacerse mediante aspiración con pipetas de menor diámetro que la cápsula, o sumergiendo las cápsulas en soluciones de baja concentración salina.

Producción in vitro.

Se estudió el desarrollo in vitro de embriones de 2 días encapsulados en carragenato, en cocultivo con células oviductales. Las células del epitelio oviductal se aislaron y cultivaron siguiendo el protocolo descrito por Eyestone and First (1989). 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 cúmulos 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 de EGF. La maduración se realizó en una atmósfera humidificada con 5% de CO2, a 39°C Durante 22-26 h.

Los COCs madurados 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 2×10^6/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 durante 2 días. En el día 2 los embriones de excelente calidad se dividieron al azar en dos grupos: encapsulados (n=96) y control (n=95). Diez embriones, la mitad de ellos encapsulados, se transfirieron a cada gota de cultivo que contenían vesículas oviductales. El cultivo se realizó en una atmósfera de 5% CO_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

Para encapsular casi un centenar de embriones se necesitan 3-4 minutos. De los 96 embriones originales, se consiguen encapsular 89, perdiéndose 7 en el proceso de encapsulación. La mayoría de las cápsulas contenía un solo embrión. Las cáspulas formadas permanecieron intactas en los medios y condiciones de cultivo utilizados.

Los resultados de desarrollo in vitro 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 k-carragenato.

GRUPO	N	Blastocistos d7	Blastocistos eclosionados d9
ENCAPSULADOS	87	42	28
CONTROL	95	39	32

N: nº de embriones de 2 días.

En conclusión, se ha descrito un protocolo de encapsulación de embriones bovinos en k-carragenato que permite su desarrollo in vitro. Sin embargo, el método de encapsulación del carragenato requiere un estricto control de la temperatura y con él resulta difícil producir cápsulas de pequeño tamaño, porque se obstruyen las agujas o pipetas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fertil 1989; 85: 715-720.

3. 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.

4. 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.

5. Michel AS, Mestdagh MM, Axelos MAV Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. Int J Biol Macromol 1997;21: 195-200.

6. 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.