

DESARROLLO DE EMBRIONES CAPRINOS *IN VITRO*: EFECTO DEL CO-CULTIVO CON CÉLULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO

In Vitro Development of Goat Embryos: Effect of Co-culture with Oviductal Epithelial Cells

Pablo Bosch¹, María S. Blanch¹, Susana Ferrero², Hernán Díaz¹, Fernando Piccatto¹ y Ricardo A. Bosch¹

¹Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria.

²Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina. boschp@gmail.com.

RESUMEN

El desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* que permitan obtener altos porcentajes de embriones viables es de gran importancia para la implementación de biotecnologías como el clonado y la transferencia de genes. Estudios tendientes a mejorar la eficiencia de los sistemas de cultivo embrionario son especialmente importantes en ganado caprino por el escaso desarrollo de estos métodos en dicha especie. El objetivo del presente estudio fue comparar el desarrollo de embriones caprinos fecundados *in vivo* cultivados: a) con células epiteliales de oviducto caprino (CEO), b) en fluido sintético de oviducto (SOF; del Inglés: *synthetic oviduct fluid*) o c) en medio condicionado por células epiteliales de oviducto caprino (MC). Embriones de 1-8 células colectados del oviducto de cabras superovuladas se cultivaron *in vitro* durante 4-5 días en los diferentes tratamientos. Al término del cultivo se estableció el estadio de desarrollo embrionario alcanzado y el número de células por embrión a partir de embriones teñidos con lacmoid. Un mayor porcentaje de embriones se desarrollaron hasta el estado de mórula/blastocisto en cocultivo comparado con los cultivados en SOF (75% vs. 41% respectivamente; $P < 0,05$) o MC (5,5%); mientras que el SOF resultó superior al MC para sustentar el desarrollo de los embriones caprinos hasta mórula/blastocisto. Los embriones producidos en cocultivo con CEO tenían más células que los cultivados en SOF (15,3 vs. 8,1 células/embrión; $P < 0,05$) y estos últimos más que los cultivados en MC. La viabilidad de los embriones generados en SOF se confirmó mediante transferencia a una cabra receptora, seguido por el nacimiento de 2 cabritos. En conclusión el cocultivo con CEO brinda mejores condiciones para sustentar el desarrollo *in vitro* de embriones caprinos en relación con los otros dos sistemas estudiados.

Palabras clave: Embrión, cultivo *in vitro*, ganado caprino, cabras, oviducto, sincronización del estro.

ABSTRACT

Development of reliable *in vitro* culture systems to produce high percentages of viable embryos is instrumental in the application of biotechnologies such as cloning and transgenesis. This is especially true for caprine species in which *in vitro* technology for embryo culture has been poorly developed. The objective of this study was to compare *in vitro* development of *in vivo* fertilized caprine embryos in: a) coculture with caprine oviductal epithelial cells (OEC), b) synthetic *oviduct* fluid (SOF), or c) medium conditioned by oviductal epithelial cells (CM). *In vivo* fertilized 1-8 cell caprine embryos collected by oviductal flushing were allocated to treatments and cultured for 4-5 days *in vitro*. At the end of the culture period, embryonic development was recorded and the number of cells per embryo was determined in lacmoid-stained embryos. A significantly higher percentage of embryos reached the morula/blastocyst stage in coculture compared with those cultured in SOF (75% vs. 41% respectively; $P < 0.05$) or CM (5.5%); SOF was superior to CM to supporting goat embryo development. Likewise, embryos grown in coculture with OEC had more cells than those cultured in SOF (15.3 vs. 8.1 cells/embryo; $P < 0.05$). Cell counts were higher in embryos cultured in SOF than those originated from CM. In conclusion, coculture of goat embryos with OEC provided superior conditions to support *in vitro* development of early-stage goat embryos compared with the other treatments studied.

Key words: Embryo, *in vitro* culture, caprine, goat, oviduct, estrous synchronization.

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* es esencial para el desarrollo e implementación de tecnologías que implican la manipulación embrionaria, tales como el clonado por trans-

ferencia nuclear, el sexado de embriones y la producción de animales transgénicos. El desarrollo de sistemas adecuados para el cultivo *in vitro* de embriones micromanipulados hasta estadios de desarrollo que permitan su transferencia a hembras receptoras es fundamental para el éxito de dichas biotecnologías. Asimismo, la disponibilidad de gran número de embriones generados por técnicas *in vitro* es de considerable valor para estudiar la biología del desarrollo de embriones mamíferos previo a la implantación.

En general, el cultivo *in vitro* se asocia a una reducida velocidad de desarrollo y viabilidad embrionaria [40, 43], efectos que son más marcados a medida que aumenta el tiempo de cultivo [7, 23]. Un hallazgo constante, bajo ciertas condiciones de cultivo *in vitro*, es el cese del desarrollo embrionario o "bloqueo" del desarrollo [4, 50]. En un estudio preliminar [50], 89 embriones caprinos de 1-8 células no sobrepasaron el estado de mórula cuando se cultivaron en medio de Whitten o Ham F10 suplementados con albúmina sérica bovina (BSA) (1,5%) o suero fetal bovino (10%). Otros resultados indican que el bloqueo del desarrollo en embriones caprinos cultivados *in vitro* se produce en el estado de 8-16 células [40].

El cocultivo de embriones con células somáticas ha sido utilizado extensamente para estimular el desarrollo *in vitro* de embriones [10, 25, 28, 37, 41]. Los dos tipos celulares más utilizados para el cocultivo de embriones son: células de la granulosa [22, 53] y células epiteliales de oviducto (CEO) [16, 21, 51]. Numerosos trabajos demuestran un efecto positivo del cocultivo con CEO sobre la velocidad de desarrollo, viabilidad luego de la transferencia y calidad morfológica de los embriones [2, 18, 19, 21, 38]. Ellington y col. [17] demostraron que embriones bovinos cocultivados con CEO en medio de Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) [11] son comparables con los obtenidos *in vivo* en términos de: número de células, porcentaje de blastocistos obtenidos y tasas de preñez logradas luego de la transferencia. Sakkas y col. [40] encontraron que un mayor porcentaje de embriones cocultivados con CEO desarrollaron más allá del estadio de 16 células comparado con los embriones cultivados en medio sin CEO. Estas observaciones sustentan la hipótesis que el ambiente del oviducto tiene cualidades únicas y esenciales para promover el desarrollo embrionario.

Una alternativa al cocultivo es el cultivo de embriones en medio condicionado por CEO caprino (MC). En general la velocidad de desarrollo de los embriones cultivados en MC es inferior a aquellos cocultivados con células de oviducto [26, 39]. Además, los embriones desarrollados en cocultivo presentan mayor número de células [44] comparado con los cultivados en medio condicionado, indicando la existencia de un efecto estimulador directo de las células en cocultivo sobre los embriones.

El medio conocido como fluido sintético de oviducto (SOF) desarrollado por Tervit y col. [43], es un medio simple cuya composición está basada en el análisis bioquímico del fluido de oviducto ovino, más el agregado de BSA. Este medio

se ha utilizado para cultivar embriones ovinos [35, 43, 47], bovinos [31, 43] y caprinos [35]. La capacidad del SOF para promover el desarrollo embrionario mejora cuando el cultivo se efectúa en una atmósfera con baja tensión de oxígeno (5-7%) [5, 20, 43]. Se ha asociado al uso del SOF una menor viabilidad, número de células y calidad embrionaria si se compara con embriones *in vivo* [15, 46]. En otro trabajo la calidad embrionaria no difirió entre embriones cultivados en SOF o cocultivados con CEO caprino, aunque el desarrollo medido en cantidad de embriones que llegaron hasta blastocisto, número de células por embrión, índice mitótico e índice picnótico tuvo un comportamiento superior en los embriones cultivados en SOF [5].

Se ha comunicado el nacimiento de cabritos a partir de embriones producidos totalmente *in vitro* [13, 28, 29], pero es limitada la información sobre sistemas de cultivo para embriones preimplantacionales caprinos. Aunque es posible adaptar sistemas de cultivo que han resultado efectivos con embriones de otras especies como la ovina o bovina, las particularidades de cada una hacen difíciles las generalizaciones. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue comparar el desarrollo de embriones caprinos fertilizados *in vivo* cultivados *in vitro*: a) con CEO, b) en fluido sintético de oviducto (SOF) o c) en medio condicionado por CEO caprino (MC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Embriones caprinos en estadio de 1-8 células fecundados *in vivo* se asignaron al azar a los siguientes sistemas de cultivo: 1) cocultivo con CEO caprino en medio de cultivo 199 (Gibco, Life Technologies Inc., USA) suplementado con 10% suero fetal bovino (TCM199); 2) cultivo en SOF; 3) cultivo en medio condicionado por CEO.

Superovulación

Como donantes de embriones se utilizaron cabritonas y cabras Anglo Nubian las cuales recibieron esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) durante 11 días. Fueron superovuladas con dosis decrecientes de FSH de origen porcino (FSH-p[®], Schering, USA; en la tercera réplica del experimento se utilizó Folltropin[®]-V, Vetrepharm Inc., Canadá) por vía intramuscular aplicadas cada 12 horas (4; 4; 2; 2; 2 y 2 mg Armour), comenzando el tratamiento 48 horas antes del retiro de las esponjas intravaginales. En ese momento también recibieron una dosis luteolítica de cloprostenol (125 µg; im; Estrumate[®], Coopers, Argentina) [8]. Con el fin de mejorar la sincronía de las ovulaciones múltiples, 40 horas después del retiro de las esponjas las cabras recibieron 100 µg de LHRH (Sigma[®], Chemical Co., USA) por vía intramuscular [14]. A partir del retiro de las esponjas, las cabras se colocaron individualmente en el corral del macho a intervalos de 12 horas y si se encontraban en celo se permitió el servicio por un macho de probada fertilidad. Los anima-

les que manifestaron celo recibieron un servicio cada 12 horas hasta la finalización del celo.

Colecta de embriones

Los embriones fueron recuperados quirúrgicamente 48-76 horas después del inicio del celo. Se utilizó xilazina (0,11 mg/Kg peso corporal, im; Rompún[®], Bayer, Argentina) y Clorhidrato de Ketamina (5,5 mg/Kg peso corporal, im; Ketamina 50[®] Holliday-Scott S.A., Argentina). Se practicó una laparotomía mediana retroumbilical, a través de la cuál se exteriorizó el tracto reproductivo. Luego de contar el número de cuerpos hemorrágicos en cada ovario se procedió a canular el oviducto en el extremo anterior con un catéter de polietileno (diámetro externo: 2 mm), el cual se fijó mediante una ligadura o pinza. Seguidamente, se introdujo una aguja con punta roma acoplada a una jeringa cargada con medio de lavado en el extremo craneal del cuerno uterino. Se ocluyó la luz del órgano con los dedos pulgar e índice por detrás de la aguja dejando fluir 10 mL de medio de lavado por el oviducto. El medio se recolectó en probetas de vidrio de volumen adecuado. Como medio de lavado o "flushing" se utilizó PBS de Dulbecco modificado (Gibco, Life Technologies Inc., EUA) pH 7,2 con el agregado de 1 mg/L de D-glucosa, 36 mg/L de piruvato de sodio, 25 µg/mL de gentamicina y 10% de suero de cabra inactivado por calor (56°C por 30 minutos). El procedimiento descrito anteriormente se repitió en el oviducto contralateral. El medio recuperado se transfirió a placas de Petri estériles para el examen bajo lupa estereoscópica. Los embriones recuperados se transfirieron a PBS fresco y se mantuvieron a 38,5°C hasta ser asignados a los diferentes tratamientos.

Obtención de CEO

El oviducto que se utilizó en cada réplica se obtuvo mediante salpingectomía unilateral de una cabra sin tener en cuenta la etapa del ciclo estral. En el animal anestesiado se exteriorizó el tracto reproductivo a través de una incisión mediana retroumbilical para proceder a la extirpación del oviducto. Las CEO se prepararon siguiendo los lineamientos metodológicos descritos por otros autores [41, 51]. Antes de proceder a la extracción de las CEO, el oviducto fue despojado de restos de mesosalpinx, se enjuagó en TCM199 con el agregado de HEPES (25 mM), 25 µg/mL de gentamicina y se secó con una gasa estéril. A continuación el oviducto se colocó en una placa estéril de 100 x 20 mm con 3 mL de medio, se tomó con una pinza el extremo uterino del oviducto y con un portaobjetos se ejerció presión sobre el oviducto y al mismo tiempo se desplazó hacia el extremo ovárico forzando de este modo la salida de las células de la mucosa por el orificio anterior del oviducto. Para dispersar parcialmente las CEO recuperadas se hicieron pasar por una aguja 26 G acoplada a una jeringa. Por último la suspensión celular se transfirió a un tubo de centrifuga conteniendo 8 mL de TCM199 y se lavaron 4 veces reemplazando el sobrenadante cada 5 minutos. La masa celular sedimentada se suspendió en el mismo medio en una relación

de 1:50 (v/v), se distribuyó en frascos para cultivo de 25 cm² y se cultivaron 20-24 horas en atmósfera de 5% de CO₂ en aire a 38,5°C y máxima humedad. Luego del cultivo las células se lavaron 2 veces en medio TCM199 como se describió anteriormente para eliminar las células muertas. De la masa de CEO sedimentadas se aspiró 1 µL que fue adicionado a microgotas de 50 µL de TCM199 preparadas bajo aceite mineral en placas para cultivo de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 3-5 horas bajo las condiciones anteriormente descritas, antes de recibir los embriones.

Preparación del medio condicionado por CEO

Siguiendo la metodología anteriormente detallada se obtuvieron CEO para preparar el medio condicionado. El sedimento celular se suspendió en 50 volúmenes de TCM199; 10 mL de la suspensión se cultivó en frascos para cultivo de 25 cm² en atmósfera de 5% de CO₂ en aire a 38,5°C y máxima humedad. Luego de 48 horas de cultivo el sobrenadante se colectó, se centrifugó (1000 g x 10 minutos) y se almacenó alicuotado a -20°C hasta su utilización.

Preparación del FSO

Se usó el medio descrito originalmente por Tervit y col. [43].

Cultivo de embriones *in vitro*

Los embriones de 1-8 células provenientes de cada donante se distribuyeron al azar en los 3 tratamientos: a) cocultivo con CEO en TCM199; b) cultivo en SOF; c) cultivo en medio condicionado por CEO. El cultivo se llevó a cabo en microgotas de 50 µL bajo aceite mineral en atmósfera de 5% de CO₂ en aire (TCM199 y cocultivo) a 38,5°C y máxima humedad durante 5 días. El cultivo de embriones en SOF se llevó a cabo en atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ a 38,5°C y máxima humedad. Cada 2 días se reemplazaron 30 µL por igual volumen de medio nuevo (grupo 1: TCM199; grupo 2: SOF; grupo 3: medio condicionado).

Determinación del desarrollo y viabilidad embrionaria

Concluido el periodo de cultivo se evaluó el estado de desarrollo embrionario determinando el número de embriones que alcanzaron el estado de mórula compacta y blastocisto.

El número total de células por embrión se determinó contando el número de núcleos teñidos con lacmoid (colorante específico para ADN) en una fracción del número total de embriones cultivados en cada tratamiento (TABLA II). Los embriones se fijaron en ácido acético (90%)-etanol (1:3, v/v), se tiñeron con dicho colorante y el número de núcleos se determinó por inspección en un microscopio de campo brillante.

Los embriones de la tercera réplica del experimento que desarrollaron hasta mórula compacta o blastocisto se transfirieron a dos cabras receptoras sincronizadas (día 7 ± 1 del ci-

clo estral, día 0 = inicio del celo). Las cabras receptoras recibieron esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) simultáneamente con el grupo de donantes de embriones, pero para lograr una mejor sincronización, las esponjas se retiraron 12 horas antes. En el momento del retiro recibieron 350 UI de PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada) por vía intramuscular. Los embriones se transfirieron mediante una laparotomía mediana retroumbilical previa anestesia [3]. Los embriones se implantaron en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con el(los) cuerpo(s) lúteo(s). Con una aguja con punta roma se practicó un pequeño orificio en la pared uterina a través del cuál se introdujo la pipeta con los embriones, depositándolos a 2-3 cm de distancia del orificio practicado. La supervivencia embrionaria se determinó por la presencia del embrión con latido cardíaco al examen ultrasonográfico en el día 35 post-transferencia. Se utilizó un ecógrafo de diagnóstico de tiempo real, modo B con un transductor lineal para uso transrectal de 5,0 MHz (Aloka SSD 500. Overseas Monitor Corporation Ltd. Vancouver, BC, Canadá).

Análisis estadístico

Para comparar el porcentaje de embriones que alcanzaron el estado de mórula/blastocisto en los diferentes tratamientos se aplicó el Test Ji cuadrado χ^2 de independencia [33]. Para la variable número de células totales por embrión en los diferentes tratamientos se aplicó el Test no paramétrico Kruskal Wallis [32] (procedimiento alternativo a la prueba F del análisis de la varianza) con los datos transformados por rangos. Se realizó un test a posteriori para efectuar comparaciones de a pares. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico de distribución gratuita R [36]. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias con $P < 0,05$.

RESULTADOS

El 88,8% (16/18) de las cabras superovuladas presentaron celo dentro de las 24-36 horas de retiradas las esponjas intravaginales mientras que 2 cabras no manifestaron comportamiento estral, razón por la cual se las excluyó del experimento.

Se obtuvieron 193 embriones de 1-8 células (FIG. 1) y 23 no fecundados (11,9%) en 3 repeticiones del experimento (TABLA I). De los 193 embriones fertilizados colectados, 166 fueron utilizados para el cultivo *in vitro* en el presente estudio.

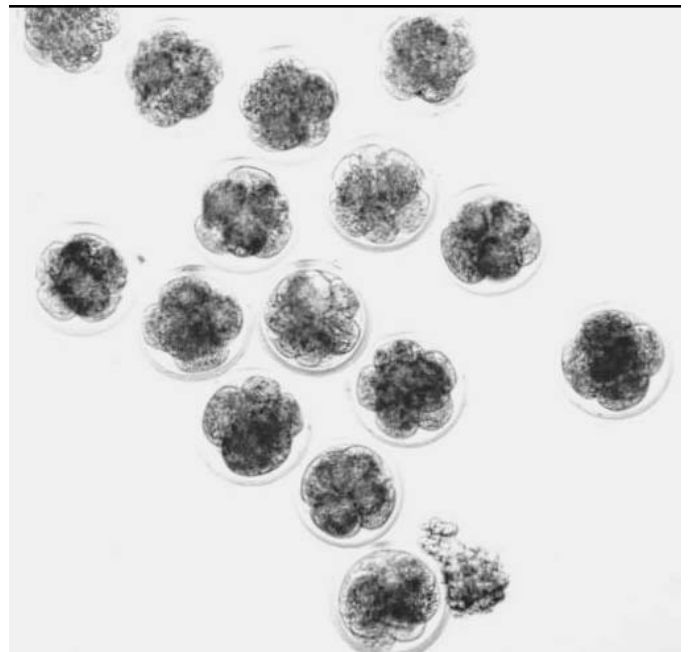


FIGURA 1. EMBRIONES CAPRINOS INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE SER COLECTADOS QUIRÚRGICAMENTE (100X) / GOAT EMBRYOS IMMEDIATELY AFTER SURGICAL COLLECTION (100X).

La respuesta superovulatoria obtenida en el presente experimento medida en número medio de cuerpos lúteos no se aparta de la reportada en un estudio previo [3], teniendo en cuenta el tratamiento superovulatorio, época del año, raza y categoría de los animales utilizados.

Un mayor porcentaje de embriones se desarrollaron hasta el estado de mórula/blastocisto en cocultivo comparado con los cultivados en SOF (75% vs. 41% respectivamente; $P < 0,05$) o MC (5,5%); mientras que el SOF resulto superior al MC para sustentar el desarrollo de los embriones caprinos hasta mórula/blastocisto (TABLA II). La morfología de los embriones generados en los diferentes sistemas de cultivo *in vitro* se muestran en la FIG. 2. En cuanto al número medio de células, los embriones en cocultivo con CEO tenían más células (FIG. 3) que los cultivados en SOF (15,3 vs. 8,1 células/embrión respectivamente; $P < 0,05$) y estos últimos más que los cultivados en MC (TABLA II).

Mórulas y blastocistos generados en cocultivo con CEO y SOF en la tercera repetición del experimento fueron transferidos a 2 cabras receptoras sincronizadas para determinar la

TABLA I
RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y NÚMERO DE EMBRIONES COLECTADOS EN TRES RÉPLICAS DEL EXPERIMENTO / SUPEROVULATORY RESPONSE AND NUMBER OF EMBRYOS COLLECTED IN THREE REPLICATES OF THE EXPERIMENT

Nº de cabras que respondieron al tratamiento superovulatorio en las 3 réplicas	Nº de cuerpos lúteos	Nº de embriones colectados por cabra [‡]	Eficiencia de la colecta [†]
16	14,8 ± 9,3*	11,3 ± 8,7*	76,3%

* Media ± desviación estándar. † Nº de embriones colectados/Nº de cuerpos lúteos x 100. ‡ Incluye infertilizados.

TABLA II

DESARROLLO Y NÚMERO DE CÉLULAS EN EMBRIONES CAPRINOS CULTIVADOS *IN VITRO* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO / *IN VITRO* DEVELOPMENT AND NUMBER OF CELLS OF EMBRYOS CULTURED IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Parámetro	Sistema de cultivo		
	CEO	SOF	MC
Nº de mórulas y blastocistos/Nº de embriones cultivados (%)	42/56 ^a (75,0%)	23/56 ^b (41,0%)	3/54 ^c (5,5%)
Nº medio de células por embrión (rango)	15,3 (n = 27) ^a (2-30)	8,1 (n = 20) ^b (3-13)	3,3 (n = 13) ^c (1-7)

^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes (P < 0,05).

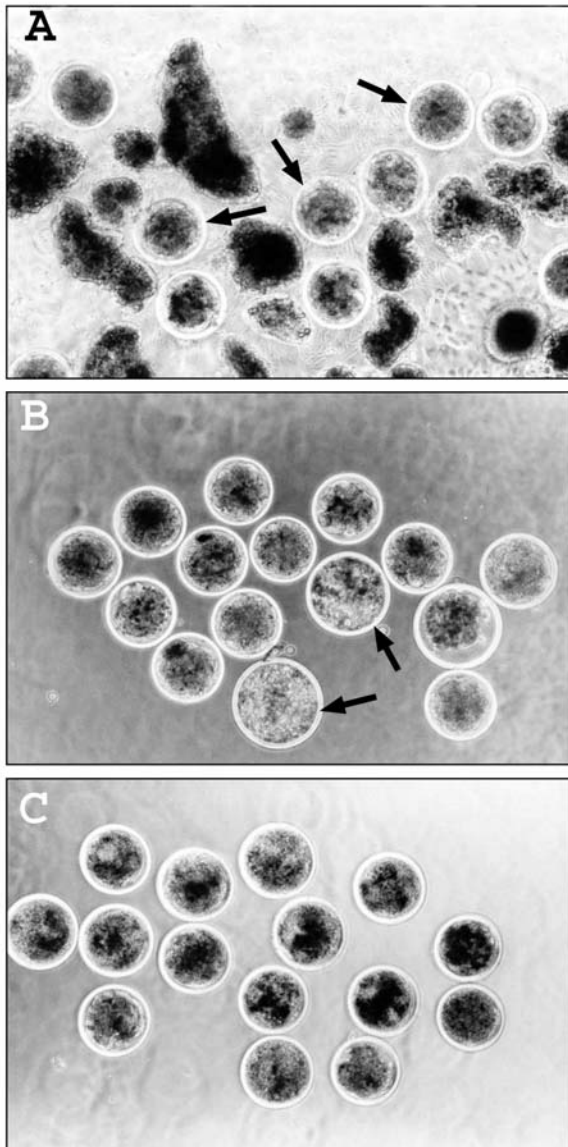


FIGURA 2. EMBRIONES CAPRINOS LUEGO DE 4 DÍAS DE CULTIVO CON CEO (A), EN SOF (B) O MC (C). FLECHAS EN (A) SEÑALAN EMBRIONES EN ESTADO DE MÓRULA Y EN (B) BLASTOCISTOS. EMBRIONES EN (C) HABÍAN DEGENERADO (A, B Y C = 100X) / GOAT EMBRYOS AFTER 4 DAYS OF CULTURE WITH OEC (A), IN SOF (B) OR CM (C). ARROWS POINT TO MORULA STAGE EMBRYOS IN (A) AND BLASTOCYSTS IN (B). EMBRYOS CULTURED IN CM DEGENERATED (C). (A, B AND C = 100X).

viabilidad de los embriones producidos. Dado que ninguno de los embriones cultivados en MC alcanzó el estado de mórula o blastocisto no se efectuaron transferencias de embriones cultivados en dicho medio. Las 2 cabras receptoras presentaron celo dentro de las 24-48 horas luego del retiro de las esponjas intravaginales. Solo se transfirieron 4 blastocistos y 3 mórulas cultivados en SOF al cuerno uterino izquierdo de una cabra receptora. Dicho animal presentaba 3 cuerpos lúteos (CL) en el ovario izquierdo y 2 en el derecho.

Por otro lado, 8 mórulas obtenidas a partir del cocultivo con CEO se transfirieron al útero de otra cabra receptora que presentó un único CL.

Al examen ultrasonográfico 35 días post-transferencia, en la cabra receptora de los embriones SOF se evidenció la presencia de fluido dentro del útero y 2 estructuras ecogénicas con latido cardíaco. En consecuencia la supervivencia embrionaria en este grupo alcanzó un 28,57% (2/7). La cabra receptora parió 2 cabritos en buen estado de salud 147 días después de la transferencia. La cabra receptora de los embriones cocultivados con CEO repitió celo a los 14 días de haber recibido los embriones y a la exploración ecográfica no mostró signos de gestación.

Luego de 24 horas de cultivo *in vitro* las CEO presentaban movimiento activo de los agregados celulares, denominados “gusanos” por su aspecto y movilidad (FIG. 4 A). A las 48 horas de cultivo las células comenzaron a adherirse al fondo de la placa de cultivo y alcanzaron 70-80% de confluencia a las 72 horas (FIG. 4 B), pudiéndose observar en este momento células con cilios en movimiento adheridas al fondo del frasco de cultivo.

DISCUSIÓN

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, el cocultivo mostró ser claramente superior en relación a los otros dos tratamientos en su capacidad para promover el desarrollo embrionario *in vitro*. Tanto el porcentaje de embriones que alcanzaron el estado de mórula como el número de células por embrión fue significativamente superior bajo condiciones de cocultivo (TABLA II). Numerosos trabajos señalan un efecto positivo de las células en cocultivo sobre el desarrollo embrionario [2, 18, 19, 21, 26, 38, 40, 52]. Existen eviden-

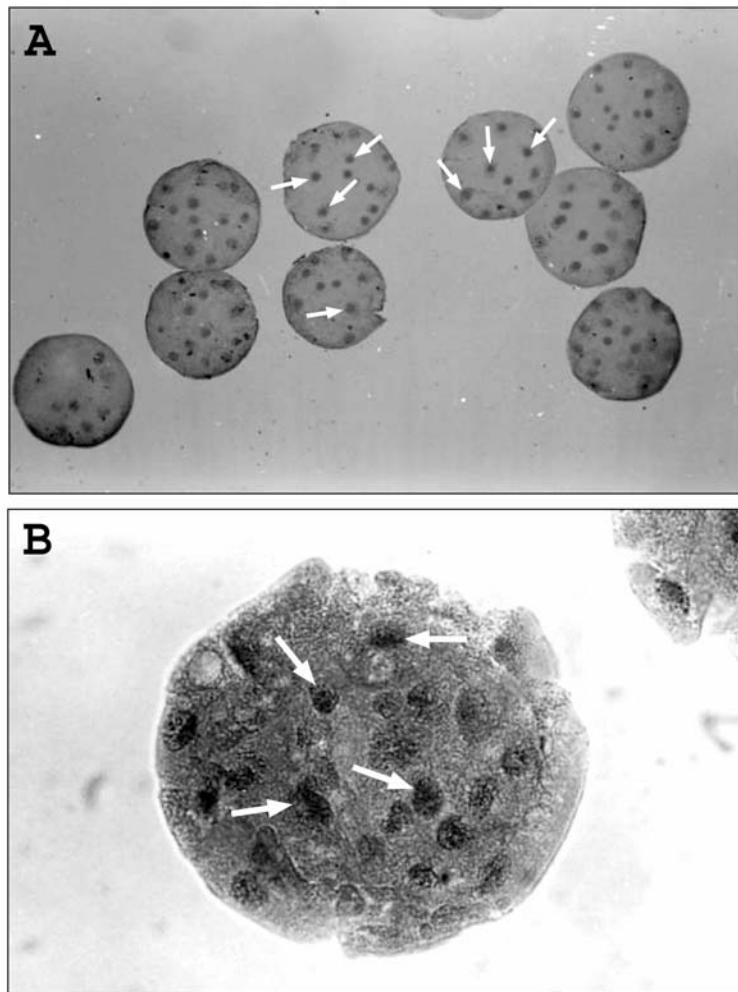


FIGURA 3. EMBRIONES CAPRINOS LUEGO DE SER COCULTIVADOS CON CEO DURANTE 4 DÍAS FUERON FIJADOS Y TEÑIDOS PARA DETERMINAR EL NÚMERO DE CÉLULAS POR EMBRIÓN. SE PUEDEN APRECIAR LOS NÚCLEOS DE LAS BLASTÓMERAS TEÑIDOS CON LACMOID (FLECHAS) (A = 100X; B = 320X) / GOAT EMBRYOS CULTURED DURING 4 DAYS WITH OEC WERE FIXED AND STAINED TO DETERMINE THE NUMBER OF CELLS PER EMBRYO. NOTE BLASTOMERE NUCLEI STAINED WITH LACMOID (ARROWS) (A = 100X; B = 320X).

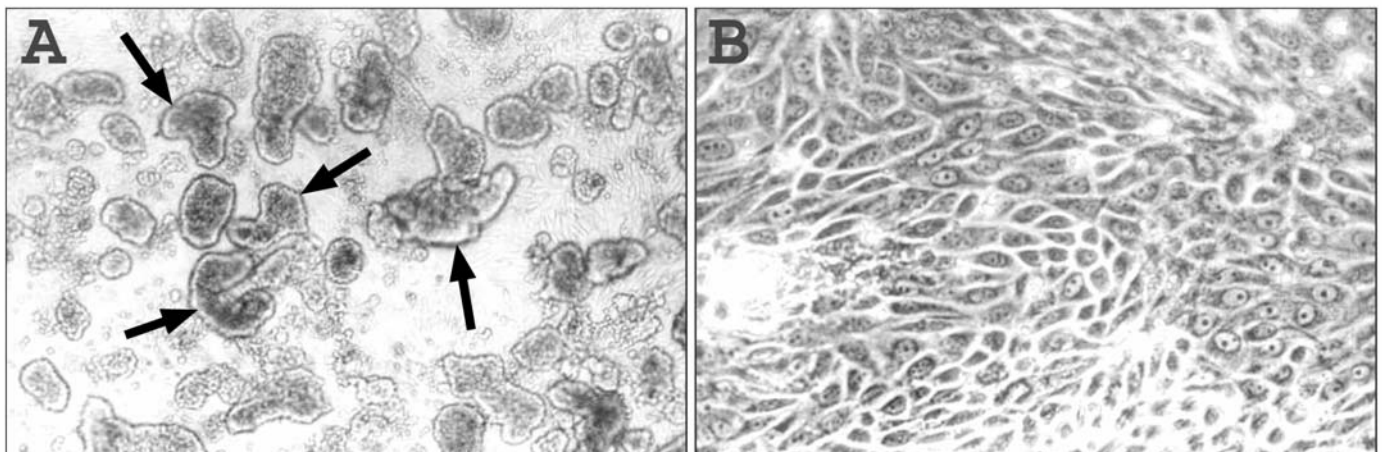


FIGURA 4. (A) CEO DE ORIGEN CAPRINO LUEGO DE 24 HORAS DE CULTIVO *IN VITRO* (100X). SE OBSERVAN LOS CARACTERÍSTICOS "GUSANOS". (B) CEO DE ORIGEN CAPRINO LUEGO DE 72 HORAS DE CULTIVO *IN VITRO* FORMANDO UNA MONOCAPA EN EL FONDO DEL FRASCO DE CULTIVO (320X) / (A) CAPRINE OEC 24 HOURS AFTER PLATING (100X). NOTE THE CHARACTERISTIC "WORMS". (B) CAPRINE OEC 72 HOURS AFTER PLATING GREW AS A MONOLAYER ATTACHED TO THE BOTTOM OF THE CULTURE FLASK (320X).

cias de que las CEO en cultivo no solamente aportarían sustancias clave para el desarrollo embrionario, sino que retirarían sustancias embrióticas [4, 27]. Sin embargo, los sistemas de cocultivo presentan ciertas desventajas tales como: la introducción de agentes infecciosos al medio de cultivo de los embriones [30] y una mayor complejidad técnica para su implementación en comparación con el uso de medios de composición definida [4, 24].

Una menor proporción de los embriones cultivados en SOF alcanzó el estado de mórula/blastocisto (41,0%) con un número medio de células por embrión inferior comparado con los embriones generados en cocultivo. Tervit y col. [43] utilizaron por primera vez el SOF para cultivar un número pequeño de embriones ovinos y bovinos de 1 a 8 células durante 3 a 6 días. Estos autores comunican que 90% de los embriones ovinos y un 46,6% de embriones bovinos llegaron al estado de mórula/blastocisto. Más recientemente el SOF se ha utilizado con modificaciones de la fórmula original para cultivar embriones preimplantacionales de diferentes especies de animales domésticos con resultados variables [5, 20, 42]. Algunos requerimientos específicos de los embriones caprinos bajo condiciones de cultivo *in vitro* pueden explicar el fracaso de la fórmula original del SOF para estimular el desarrollo embrionario en esta especie.

Aunque existen numerosos métodos para estimar con mayor o menor precisión la viabilidad embrionaria [9], la prueba concluyente es la capacidad para continuar el desarrollo una vez transferidos al útero de la hembra receptora y establecer la preñez. En el presente estudio los embriones obtenidos a partir del SOF fueron capaces de continuar el desarrollo en el útero de la cabra receptora. Sin embargo no podemos afirmar que los embriones obtenidos del cocultivo con CEO eran inviábiles, ya que el establecimiento de la preñez no depende solamente de factores embrionarios sino también de factores maternos. Entre estos últimos es esencial la presencia de por lo menos un CL funcional [12] y niveles séricos de progesterona adecuados para promover los cambios secretorios uterinos que permitan el desarrollo embrionario. La cabra que recibió los embriones provenientes del cocultivo con CEO presentó un solo CL de tamaño mediano, con aspecto morfológico que podría haber sido compatible con un CL en regresión, aunque sin conocer los perfiles de progesterona sérica no es posible afirmar la ocurrencia de este fenómeno. En ganado caprino se ha reportado un porcentaje elevado de animales con regresión luteal temprana luego de tratamientos superovulatorios con PMSG [6]. En el presente estudio, la ocurrencia de un CL de vida corta puede explicar la incapacidad de los embriones cocultivados con CEO para continuar el desarrollo luego de transferidos al útero receptor.

El porcentaje de embriones cultivados en SOF que continuó su desarrollo hasta el final de la gestación luego de la transferencia alcanzó el 28,57%. Este valor es comparativamente inferior al reportado para embriones caprinos transferidos en fresco (50 a 60%) [1, 3], no contándose con información referente al porcentaje de supervivencia de embriones en

la misma especie producidos *in vitro*. En el presente estudio, el hecho de haber transferido 7 embriones al mismo cuerno uterino puede haber afectado la tasa de supervivencia obtenida. Es conocido que existen interacciones entre los embriones en especies múltiparas. Estudios de transferencia embrionaria han revelado factores competitivos entre embriones de diferente estado de desarrollo *in útero*. Cuando se transfirieron embriones ovinos de día 4 y 8 a receptoras en el día 6, el 70% de los embriones de día 8 sobrevivieron hasta el día 34, mientras que solamente sobrevivieron el 25% de los embriones atrasados [49]. Esto sugiere que variaciones en el estado de desarrollo entre embriones de una misma camada conduce a una inevitable pérdida embrionaria.

Durante las primeras 24 horas de cultivo las CEO permanecieron en suspensión mostrando el característico movimiento de los agregados celulares. A partir de las 24 horas comenzó la adherencia al fondo de la placa alcanzando un 70-80% de confluencia a las 72 horas de cultivo. Un comportamiento similar se ha reportado para CEO bovinas cultivadas *in vitro* [51]. Utilizando un método enzimático para la obtención de las CEO bovinas, se observó el primer signo de adhesión a las 72 horas de cultivo, y a los 7 días de cultivo confluencia total de las monocapas celulares [48]. A pesar de haber sido utilizado el cocultivo con CEO de origen caprino para estimular el desarrollo *in vitro* de embriones en esta especie [34, 40], al presente no se ha caracterizado la capacidad de adherencia y velocidad de crecimiento *in vitro* de CEO de origen caprino.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten asignarle al cocultivo con CEO una capacidad superior para sustentar el desarrollo de embriones preimplantacionales caprinos en relación con los otros dos sistemas estudiados. El SOF presenta una menor capacidad para estimular el desarrollo embrionario *in vitro* comparado con el cocultivo, pero los embriones obtenidos son capaces de continuar desarrollando una vez transferidos al útero de una cabra receptora. Estudios adicionales serán necesarios para establecer la viabilidad de los embriones originados en cocultivo con CEO.

AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue subsidiado por PRIRA-CONICET y Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M.; SEAMARK, R.F. Superovulation treatments and embryo transfer in angora goats. **J. Reprod. Fertil.** 67:403-410. 1983.
- [2] BALL, B.A.; MILLER, G.P. Survival of equine embryos cocultured with equine oviductal epithelium from the four-to

- eight-cell to the blastocyst stage after transfer to synchronous recipient mares. **Theriogenol.** 37:979-991. 1992.
- [3] BARIL, G.; BREBION, P.; CHSNE, P. **Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre.** Étude FAO production et santé animales 115, Rome, Italy, 105 pp. 1993.
- [4] BAVISTER, B.D. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. **Theriogenol.** 29:143-154.1988.
- [5] BERNARDI, M.L.; FLECHON, J.E.; DELOUIS, C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. **J. Reprod. Fertil.** 106:161-167. 1996.
- [6] BONDURANT, R.H. Embryo transfer in sheep and goats. In: D. A. Morrow (Ed.) **Current therapy in theriogenology II.** W. A. Saunders Company. 63-66 pp. 1986.
- [7] BOWMAN, P.; MCLAREN, A. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 23:693-704. 1970.
- [8] BREBION, P.; BARIL, G.; COGNIE, Y.; VALLET, J.C. Transfert d'embrions chez les ovins et les caprins. **Ann. Zootech.** 41:331-339. 1992.
- [9] BUTLER, J.E.; BIGGERS, J.D. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. **Theriogenol.** 31:115-126.1989.
- [10] CAMOUS, S.; HEYMAN, Y.; MEZIOU, W.; MENEZO, Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. **J. Reprod. Fertil.** 72:479-485. 1984.
- [11] CHATOT, C.L.; ZIOMEK, C.A.; BAVISTER, B.D.; LEWIS, J.L.; TORRES, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. **J. Reprod. Fertil.** 86:679-688. 1989.
- [12] COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenol.** 59:171-188. 2003.
- [13] CROZET, N.; DESMEDT, V.; AHMED-ALI, M.; SEVELLEC, C. Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. **Theriogenol.** 39:206 abstr. 1993.
- [14] DE SMEDT, V.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; MARTINO, A.; COGNIE, Y. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenol.** 37:1049-1060. 1992.
- [15] DUBY, R.T.; DOBRINSKY, J.R.; ROBL, J.R.; OVERSTROM, E.W.; BAGUISI, A.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. In vivo and in vitro development of embryos from superovulated beef heifers. **Theriogenol.** 37:204. 1992.
- [16] ELLINGTON, J.E.; CARNEY, E.W.; FARRELL, P.B.; SIMKIN, M.E.; FOOTE, R.H. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. **Biol. Reprod.** 43:97-104. 1990.
- [17] ELLINGTON, J.E.; FARRELL, P.B.; FOOTE, R.H. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus in vivo development in the cow. **Theriogenol.** 34:837-844. 1990.
- [18] ELLINGTON, J.E.; FARRELL, P.B.; SIMKIN, M.E.; FOOTE, R.H.; GOLDMAN, E.E.; MCGRATH, A.B. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.** 89:293-299. 1990.
- [19] EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. **J. Reprod. Fertil.** 85:715-720. 1989.
- [20] FUKUI, Y.; MCGOWAN, L.T.; JAMES, R.W.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **J. Reprod. Fertil.** 92:125-131. 1991.
- [21] GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.** 81:23-28. 1987.
- [22] GOTO, K.; KAJIHARA, Y.; KOSAKA, S.; KOBAYASHI, M.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 83:753-758. 1988.
- [23] HARLOW, G.M.; QUINN, P. Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. **Aust. J. Biol. Sci.** 35:187-193. 1982.
- [24] HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; SIRISATHIEN, S.; BOSCH, P.; CHO, H.S.; LOTT, J.D.; HAWKINS, L.L.; HOLLETT, R.B.; COLEY, S.L.; BRACKETT, B.G. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media. **Anim. Reprod. Sci.** 69:151-158. 2002.
- [25] HEYMAN, Y.; MENEZO, Y.; CHESNE, P.; CAMOUS, S.; GAENIER, V. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. **Theriogenol.** 27:59-68. 1987.
- [26] IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M.T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat ivm-ivf oocytes. **Theriogenol.** 52:847-861. 1999.
- [27] KANE, M.T.; CARNEY, E.W.; ELLINGTON, J.E. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. **Theriogenol.** 38:297-313. 1992.

- [28] KESKINTEPE, L.; DARWISH, G.M.; KENIMER, A.T.; BRACKETT, B.G. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. **Theriogenol.** 42:527-535. 1994.
- [29] KESKINTEPE, L.; LUVONI, G.C.; RZUCIDLO, S.J.; BRACKETT, B.G. Procedural improvements for in vitro production of viable uterine stage caprine embryos. **Small Rum. Res.** 20:247-254. 1996.
- [30] LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Virus Res.** 87:69-77. 2002.
- [31] MCLAUGHLIN, K.J.; MCLEAN, D.M.; STEVENS, G.; ASHAM, R.J.; LEWIS, P.A.; BARTSCH, P.A.; SEAMARK, R.F. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. **Theriogenol.** 33:1191-1199. 1990.
- [32] MENDENHALL, W.; WACKERLY, D.; SCHAFFER, R. Estadística matemática con aplicaciones. Grupo Editorial Iberoamérica. 613-615 pp. 1994.
- [33] MONTGOMERY, D. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. 112-114 pp. 1991.
- [34] PRICHARD, J.F.; POOL, S.H.; BLAKEWOOD, E.G.; MENEZO, Y.; GODKE, R.A. Culture of early-stage caprine embryos using goat oviductal cell monolayers. **Theriogenol.** 35:259 abst. 1991.
- [35] QUINN, P.; WARNES, G.M.; WALKER, S.K.; SEAMARK, R.F. Culture of preimplantation sheep and goat embryos. In: D. R. Lindsay and D. T. Pearce (Eds.) **Reproduction in sheep.** Aust. Acad. Sci. and Aust. Wool Corp, Canberra. 289-290 pp. 1984.
- [36] The R Foundation for Statistical Computing. R-Program. Version 1.9.1. 2004.
- [37] REXROAD, C.E. Co-culture of domestic animal embryos. **Theriogenol.** 31:105-114. 1989.
- [38] REXROAD, C.E., JR.; POWELL, A.M. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. **J. Anim. Sci.** 66:947-953. 1988.
- [39] RIEGER, D.; GRISART, B.; SEMPLE, E.; VAN LANGENDONCKT, A.; BETTERIDGE, K.J.; DESSY, F. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. **J. Reprod. Fertil.** 105:91-98. 1995.
- [40] SAKKAS, D.; BATT, P.A.; CAMERON, A.W. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos in vivo and in vitro. **J. Reprod. Fertil.** 87:359-365. 1989.
- [41] SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; GUSTAFSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In vitro development up to hatching of bovine in vitro-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. **Theriogenol.** 39:1067-1079. 1993.
- [42] TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenol.** 37:963-978. 1992.
- [43] TERVIT, H.R.; ROWSON, L.E. Birth of lambs after culture of sheep ova in vitro for up to 6 days. **J. Reprod. Fertil.** 38:177-179. 1974.
- [44] TROUNSON, A.; PUSHETT, D.; MACLELLAN, L.J.; LEWIS, I.; GARDNER, D.K. Current status of ivm/ivf and embryo culture in humans and farm animals. **Theriogenol.** 41:57-66. 1994.
- [45] VAN LANGENDONCKT, A.; VANSTEENBRUGGE, A.; DESSY-DOIZE, C.; FLECHON, J.E.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterization of bovine oviduct epithelial cell monolayers cultured under serum-free conditions. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.** 31:664-670. 1995.
- [46] WALKER, S.K.; HEARD, T.M.; SEAMARK, R.F. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: Successes and perspectives. **Theriogenol.** 37:111-126. 1992.
- [47] WALKER, S.K.; SEAMARK, R.F.; QUEEN, P.; WARNES, G.M.; ASHAM, R.J.; SMITH, D.H.; ANCELL, P. Culture of pronuclear embryos of sheep in a simple medium. In: **Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.**, Dublin, Ireland. 06/25-30. 483-485 pp. 1988.
- [48] WALTER, I. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). **Anat. Rec.** 243:347-356. 1995.
- [49] WILMUT, I.; ASHWORTH, C.J.; SPRINGBETT, A.J.; SALES, D.I. Effect of variation in embryo stage on the establishment of pregnancy, and embryo survival and growth in ewes with two embryos. **J. Reprod. Fertil.** 83:233-237. 1988.
- [50] WRIGHT, J.R.W.; BONDIOLI, K.R. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. **J. Anim. Sci.** 53:702-729. 1981.
- [51] XU, K.P.; YADAV, B.R.; RORIE, R.W.; PLANTE, L.; BETTERIDGE, K.J.; KING, W.A. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.** 94:33-43. 1992.
- [52] YADAV, P.S.; SAINI, A.; KUMAR, A.; JAIN, G.C. Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of goat ivf embryos. **Anim. Reprod. Sci.** 51:301-306. 1998.
- [53] YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G. Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts in vitro. **Theriogenol.** 36:11-21. 1991.