

XX REUNION NACIONAL AMVEC 85

TITULO "CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES DE CERDO"
AUTOR (es) TRUJANO DE I. M.* ; IGLESIAS S., G.
INSTITUCION FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUANTITATIVOS
AREA REPRODUCCION y/o PATOLOGIA

INTRODUCCION

Estudios recientes han contribuido al desarrollo de técnicas de cultivo in vitro de embriones (post-implantación) del cerdo (Godkin et al. 1982a) y borrego (Godkin et al. 1982b), pero el período de cultivo en ambos experimentos fué por menos de 48 horas. Por lo tanto pocos cambios evolutivos fueron observados.

En el período de morfogénesis y organogénesis es cuando los agentes teratógenos son capaces de causar malformaciones (New, 1978). La existencia de una técnica efectiva de cultivo in vitro de embriones de cerdo nos permitiría estudiar el efecto patogénico que en embriones pre y post-implantación producirían varios agentes bajo condiciones controladas y sin complicación de tejido materno. El objetivo de este trabajo fué el desarrollo de una técnica de cultivo in vitro para estadios tempranos del embrión de cerdo semejantes a aquellas desarrolladas para ratón (Tam & Snow, 1980) y rata (New et al. 1976).

MATERIAL Y METODOS

Animales: Un total de 4 cerdas con ciclo estral establecido fueron usadas. Todas fueron servidas cada día del estro y el último día de servicio se tomó como día 0. Las cerdas fueron sacrificadas a los 12-13 días de gestación.

Colección y cultivo de embriones: El útero fué rápidamente removido y transportado a un Laboratorio con condiciones de esterilidad. Los blastocitos obtenidos luego de un minucioso lavado fueron observados al microscopio estereoscópico para la identificación de embriones. Posteriormente se cortaron las orillas del saco trofoblástico y los embriones fueron colocados en botellas in-

- 2 -

dividuales que contenían 6ml de suero de cerdo adicionado con medio M199 y antibióticos.

Los embriones fueron incubados a 32°C en una atmósfera de 5%CO₂/95%O₂ ó bien de 5%CO₂ en aire. Durante los cuatro días de cultivo las botellas se mantenían bajo rotación constante (40 rpm) proporcionada por un incubador con rodillos.

Examinación de embriones : Los embriones fueron examinados antes del cultivo y diariamente, durante 4 días, antes de cambiarles el medio y gas.

El desarrollo fué calificado en base a observaciones cuantitativas: a) Somites (número)

b) Latido cardíaco (frecuencia)

c) Longitud embrionaria (mm)

y cualitativas: a) Pliegues neurales (cierre y diferenciación primaria de la región cefálica)

b) Vascularización (en alantoide y saco vitelino).

Método estadístico: Fisher's exact test y "t" test fueron usadas para encontrar la significancia de las diferencias entre los resultados usando 95%O₂/5%CO₂ y 5%CO₂ en aire.

RESULTADOS

En este experimento los 32 embriones observados antes del cultivo se encontraban con "primitive streak" y pliegues neurales abiertos y al final del cultivo (4 días) varias estructuras embrionarias fueron observadas demostrando esto el proceso evolutivo seguido por los embriones. Las estructuras observadas fueron: Somites, cierre de los pliegues neurales y diferenciación primaria de la región cefálica, latido cardíaco, vesículas óptica y ótica.

La Tabla I nos muestra que los embriones cultivados en 5%CO₂ en aire se desarrollaron significativamente mejor que aquellos que estuvieron en 95%O₂/5%CO₂.

- 3 -

Tabla I. Características morfológicas de embriones de cerdo (12-13 días) después de 96 horas de cultivo en suero de cerdo adicionado con M199, incubados a 38°C en atmósferas de 5%CO₂ en aire ó 5%CO₂/95%O₂

	95%O ₂ /5%CO ₂	5%CO ₂ en aire	Probabilidad Fisher's exact test
Embriones con latido cardíaco	7/19	11/13	P .02
Embriones malformados	15/19	1/13	P .001
Embriones con pliegues neurales cerrados	9/19	12/13	P .02
X Número de somites ±SEM	3.3 [±]	20.3 [±]	P .001
X Longitud (mm) ±SEM	2.5 [±]	4.24 [±]	P .001

DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran semejanza con aquellos de New et al. (1976) usando embriones de rata.

Debido a que más del 90% de embriones cultivados en 5%CO₂ en aire sobrevivieron por 96 horas, sería posible emplear la técnica para estudios teratológicos in vitro observando los efectos de varios agentes sobre el desarrollo temprano.

La significancia estadística de los resultados obtenidos con los gases empleados coincide con lo publicado en la literatura (New et al. 1976; New, 1978) quienes observaron que los requerimientos de Oxígeno son menores para estadios tempranos.

REFERENCIAS

- Godkin, J.D.; Bazer, F.W.; Moffatt, J.; Sessions, F.; Roberts, R. M. (1982a) Purification and properties of a major low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. J. Reprod. Fert. 65, 141-150

Godkin, J.D.; Bazer, F.W.; Lewis, G.C.; Geisert, R.D.; Roberts, R.M.; (1982b) Synthesis and release of polypeptides by pig conceptuses during the period of blastocyst elongation and attachment.
Biol. Reprod. 27, 977-987

New, D.A.T.; (1978) Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis.
Biol. Rev. 53, 81-122

New, D.A.T.; Coppola, P.T.; Cockroft, D.L.; (1976) Improved development of head fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modification of the culture serum.
J. Reprod. Fert. 48, 219-222

Tam, P.P.L.; Snow, M.H.L.; (1980) The in vitro culture of primitive streak stage mouse embryos.
J. Embryol exp. Morph. 22, 131-143