

Gestaciones producidas con embriones bovinos clonados por transferencia nuclear[#]

Pregnancies produced by bovine embryos cloned by nuclear transfer

M A Martínez Díaz^{1*}, R Gatica¹, J E Correa¹, W Eyestone²

¹ Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

² Department of Large Animal Clinical Sciences, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Technology, USA.

SUMMARY

With the aim of obtaining pregnancies from nuclear transfer embryos reconstituted with somatic cells and enucleated oocytes, bovine oocytes from slaughterhouse were matured *in vitro* and enucleated by micromanipulation. Nuclear donor cells were obtained from the ear of an adult cow, cultured for 9 to 14 days and cryopreserved in liquid nitrogen. Confluent cells were inserted individually in the perivitelline space of enucleated oocytes and treated with 2 electric pulses to induce fusion. The reconstituted zygotes were then cultured for 2 hours and treated with ionomycin and 6-dimethylaminopurine for their activation. The embryos were cultured in synthetic oviduct fluid for 8 to 9 days to obtain the blastocyst stage. These blastocysts were transferred to recipient heifers 7 to 9 days after oestrus. The ultrasound pregnancy diagnosis was done about 30 days after recipient oestrus. Five pregnancies were obtained from 25 transfers (20%). Two of them were lost at 42 days and a third at 120 days. This seems to be the first report on pregnancies obtained by cloned embryos in Chile.

Palabras clave: transferencia nuclear, clonación, bovinos.

Key words: nuclear transfer, cloning, cattle.

INTRODUCCION

La clonación por transferencia nuclear (TN) de células somáticas es un método más efectivo para producir animales transgénicos que la técnica de inyección pronuclear (Hodges y Stice 2003).

La clonación en bovinos puede ser utilizada para la multiplicación de animales de alta productividad, por ejemplo, la multiplicación de toros con una progenie probada, o bien, para animales que expresan otras características productivas altamente deseadas. Otra alternativa para esta especie es la producción en la leche de proteínas específicas para uso farmacéutico, los denominados biorreactores (Brophy y col 2003). La generación de bovinos resistentes a enfermedades ofrece otra posibilidad en producción y sanidad animal. Se ha reportado obtención de embriones bovinos resistentes a mastitis (Wall y col 2005) y a encefalopatía espongiiforme bovina (Will Eyestone, comunicación personal).

La TN de células somáticas envuelve varios procedimientos, todos ellos pueden afectar de forma substancial la viabilidad embrionaria y fetal. Entre los factores importantes se pueden señalar, la línea celular

utilizada como donante de núcleos (revisado por Tian y col 2003), el proceso de transferencia nuclear (fusión o microinyección (Kurome y col 2003), la coordinación del ciclo celular entre la célula donante y el ovocito receptor (Campbell y col 1996) y el tiempo entre la fusión y la activación inducida (Akagi y col 2003, Martínez Díaz y col 2003). En el desarrollo de estos procesos es posible generar anomalías en la expresión génica, resultando en altas tasas de mortalidad embrionaria y fetal. Ha sido reportado que solamente 1 a 10% de los embriones transferidos llegan a término (Tamada y Kikyo 2004, Wells 2005).

Después del nacimiento de la oveja Dolly (Wilmut y col 1997), clones bovinos fueron publicados por primera vez en Japón (Kato y col 1998) y Estados Unidos (Vignon y col 1998), luego en América Latina, Brasil (Iguma y col 2005). En Chile, se ha estudiado la clonación en bovinos (Martínez Díaz y col 2004), y en la presente comunicación describe la implementación de un sistema de producción de embriones clonados de células somáticas por transferencia nuclear y el establecimiento de preñeces postransferencia de estos embriones en vaquillas receptoras.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de ovocitos receptores de núcleos. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) fueron recuperados de ovarios de hembras bovinas faenadas en un matadero ubicado a 100 km del laboratorio. Los COCs fueron

Acceptado: 14.11.2006.

[#] Proyecto financiado en parte por FONDECYT (1050495) y DID de la Universidad Austral de Chile (S-2003-7).

* Fax (56-63) 221528, mmartine@uach.cl, Casilla 567, Valdivia, Chile.

recolectados de acuerdo a protocolos antes descritos (Atabay y col 2001). Brevemente, folículos pequeños (2-7 mm de diámetro) fueron aspirados con agujas de 18 G y jeringas de 10 ml. El líquido folicular fue colocado en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) mantenidos a 37°C. Después de 20 minutos de decantación, el sedimento fue aspirado y diluido con medio oviductal sintético modificado suplementado con 25 mM Hepes (mSOF-Hepes, Takahashi y First 1992) y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los ovocitos con citoplasma homogéneo y con más de tres capas de células del cúmulo fueron cultivados bajo aceite mineral (Sigma) en gotas de 50- μ l (10-15 COCs en cada gota) de medio de cultivo de tejidos (TCM-199) con 25 mM de Hepes (Sigma) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Sigma), 0,02 unidades/ml de hormona folículo estimulante (Sigma), 1 μ g/ml de estradiol-17 β (Sigma), 0,2 mM de piruvato de sodio (Sigma) y 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina (Sigma) por 18 h, bajo atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire a 39°C. Después del cultivo de maduración, los ovocitos fueron separados de las células del cúmulo por agitación durante 4 min en 0,5 ml de solución Fosfato Buffer Dulbecco (DPBS) libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ conteniendo 0,1% hialuronidasa (Sigma). Los ovocitos que poseían citoplasma homogéneo fueron seleccionados para su enucleación.

Preparación de las células donantes de núcleos. De una vaca adulta de la raza Overo Colorado se obtuvo una biopsia de manera aséptica de aproximadamente 0,5 cm, del margen inferior auricular con un sacamuecas. El tejido fue introducido en un tubo (Falcon 2097) y suspendido en medio Dulbecco Modificado Eagle: Ham's F12 (DMEM/F12, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma) y 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina y transportado al laboratorio en condiciones de refrigeración. El cartílago fue removido y la piel fue seccionada en cubos de 1 mm. Estos cubos fueron colocados en placas de cultivo celular (Falcon 3001) con medio DMEM/F12 y recubiertos con un cubre objeto. Los explantes de piel fueron cultivados a 39°C bajo atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire durante 7-14 días. Las células que se multiplicaron alrededor de los explantes fueron tratadas con DPBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, conteniendo 0,05% tripsina (Sigma) para su desagregación, y luego cultivadas en DMEM/F12 hasta alcanzar 90% confluencia (9-14 días). Posteriormente, las células fueron suspendidas en medio DMEM/12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina y 10% de dimetilsulfóxido y almacenadas en tubos Ependorf de 1,5 ml (15-20 x 10⁴ células/ml) a -20°C durante 18 h. Luego fueron introducidas en nitrógeno líquido a -195°C. Al momento de su uso, las células fueron descongeladas a 37°C y después de repetidos lavados por centrifugación a 700 g

en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina fueron cultivadas durante 1 a 2 semanas a una concentración de 15-20 x 10⁴ células/ml en placas de cultivo celular de 4 pocillos (16 mm de diámetro; Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca) hasta obtener 90-100% de confluencia.

Enucleación de ovocitos y transferencia de núcleos. Los ovocitos fueron cultivados bajo aceite mineral en gotas de 100 μ l de medio mSOF-Hepes adicionado de 5 μ g/ml de citocalasina B (Sigma) y 5 μ g/ml de Hoechst 33342 por 20 min en incubadora con atmósfera al aire a 37,5°C. Luego, su cromatina en metafase fue removida mecánicamente (enucleación), utilizando un par de micromanipuladores (Narishige, Japón) acoplados a un microscopio invertido (Eclipse TE 300, Nikon, Tokyo, Japón) y luz ultravioleta (filtro bloqueador UV-1A, y 365 nm de excitación y 400 nm de emisión). Las células somáticas confluentes segregadas 15 minutos antes con tripsina fueron insertadas individualmente en el espacio perivitelino de un ovocito enucleado utilizando el mismo orificio hecho durante la enucleación. Para inducir fusión, cada par ovocito-célula obtenido fue colocado individualmente en un instrumento de electrofusión celular (LF 101 Bex Co., Tokyo, Japón) entre dos electrodos de alambre (fijados a un portaobjeto y separados por 1 mm), recubiertos con 1 ml de solución de 0,2 M de manitol conteniendo 0,1 mM de MgSO₄, 0,05 mM de CaCl₂, 0,5 M Hepes y 0,5 mg/ml de BSA. Luego, fueron tratados con dos pulsos eléctricos de corriente directa de 140 volts por 40 μ seg, separados por 1 segundo.

Activación y cultivo embrionario in vitro. Después del estímulo eléctrico los cigotos reconstituidos fueron cultivados bajo aceite mineral en gotas de 30 μ l de medio mSOF-Hepes por 2 horas adicionales, en incubadora con atmósfera al aire a 37,5°C. Ellos fueron luego cultivados en mSOF-Hepes conteniendo 1 μ M de ionomicina (Sigma) por 4 min. y posteriormente fueron cultivados por 4 h en mSOF suplementado con 3 mg/ml de BSA, 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) y 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire a 39°C. Los embriones fueron finalmente cultivados bajo aceite mineral en gotas de 30-50 μ l de mSOF suplementado con 3 mg/ml BSA, y 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina por 8-9 días en atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ a 39°C. La división celular y el desarrollo hasta el estado de blastocisto fue examinada a los 2 y 8-9 días después de la transferencia nuclear.

Transferencia de embriones y diagnóstico de gestación. Las vaquillas receptoras de embriones, de razas Overo Colorado y Frisón Negro, de peso entre 350 a 400 kg fueron mantenidas en pradera y suplementadas con heno y 1 kg/animal/día de concentrado peletizado durante la

estabulación nocturna. El estro fue sincronizado con una o dos inyecciones de 0,75 mg intramuscular de Tiaprost (Iliren, Intervet). Embriones en estado de blastocisto (figura 1) fueron transferidos convencionalmente al cuerno uterino ipsilateral al ovario que poseía cuerpo lúteo 7 a 9 días postcelo. Las vaquillas fueron vigiladas diariamente, durante las primeras horas de la mañana y últimas horas de la tarde, para detección de retorno al estro. En aquellas receptoras que no retornaron al estro postransferencia se realizó examen de gestación por ultrasonografía (SSD210DXII Aloka Co., Japón) a los 30 días postcelo. Las receptoras preñadas fueron monitoreadas mensualmente hasta los 120 días de gestación.

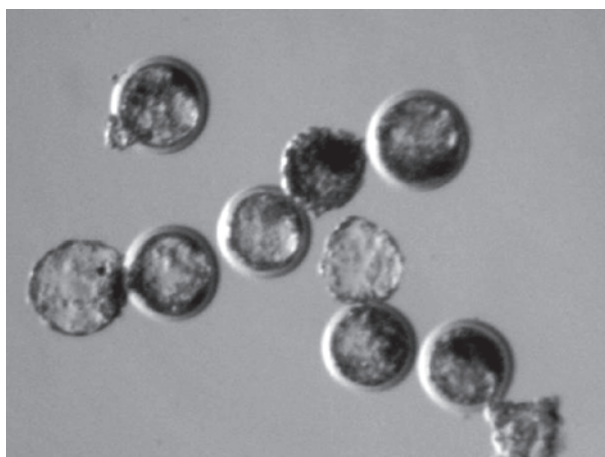


Figura 1. Blastocistos producidos por transferencia nuclear de células somáticas.

Cloned blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer.

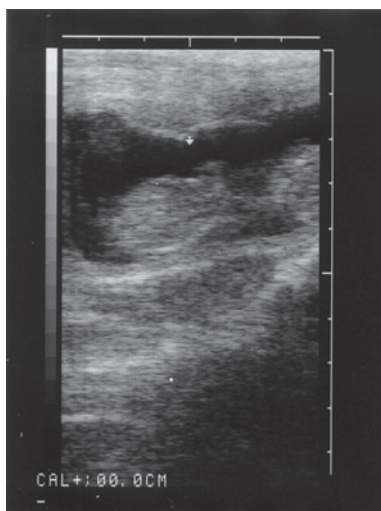


Figura 2. Gestación producida a través de embrión bovino clonado por transferencia nuclear.

Pregnancy obtained by bovine cloned embryos produced by nuclear transfer.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron 25 transferencias (50 embriones transferidos) a vaquillas receptoras y se logró preñez en 5 (20%) de ellas. Dos de estas vaquillas abortaron a los 42 días y una tercera a los 120 días. Las dos vaquillas receptoras restantes mantuvieron gestación por más de 45 días (figura 2) al momento de escribir este reporte. Se ha señalado que los embriones clonados presentan alta tasa de mortalidad embrionaria (60% o más) durante la gestación temprana y luego disminuye hasta el octavo mes de gestación (aproximadamente 30%) (Galli y col 2003, Tamada y Kikyo 2004). Las pérdidas embrionarias han sido relacionadas a defectos epigenéticos o de expresión génica del embrión (Daniels y col 2000, 2001, Wrenzycki y col 2001), que conllevan a alteraciones renales en el feto y/o anomalías placentarias, entre otras alteraciones (Palmer y col 2004, Tamada y Kikyo 2004, Farin y col 2006). De acuerdo a nuestros antecedentes, este es el primer reporte en Chile de gestaciones producidas por transferencia de embriones bovinos clonados por transferencia nuclear, utilizando células de un animal adulto.

RESUMEN

El presente estudio comunica la obtención de gestaciones de embriones clonados por transferencia nuclear de células somáticas en bovinos por primera vez en Chile. Ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero fueron madurados *in vitro* y enucleados por micromanipulación. Células donantes de núcleos fueron obtenidas de la oreja de una vaca adulta, cultivadas por 9-14 días y criopreservadas en nitrógeno líquido. Células somáticas confluentes fueron desagregadas e insertadas individualmente en el espacio perivitelino de un ovocito enucleado. Cada par ovocito-célula obtenido fue tratado con dos pulsos eléctricos para inducir su fusión y luego los embriones fueron cultivados por 2 horas y tratados con ionomicina y 6-dimetilaminopurina para su activación. Los embriones fueron cultivados en medio sintético oviductual por 8-9 días hasta el estado de blastocisto. Blastocistos fueron transferidos a vaquillas receptoras 7 a 9 días postcelo. Se realizaron 25 transferencias a vaquillas receptoras y se logró la preñez en 5 (20%) de ellas. Dos de éstas abortaron a los 42 días y una tercera a los 120 días. Las dos vaquillas preñadas restantes mantuvieron su gestación (más de 45 días) hasta el momento de escribir esta comunicación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a FONDECYT y a la DID de la Universidad Austral de Chile el financiamiento de los proyectos 1050495 y S-2003-7, respectivamente.

REFERENCIAS

- Akagi S, N Adachi, K Matsukawa, M Kubo, S Takahashi. 2003. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. *Mol Reprod Dev* 66, 264-72.
- Atabay, EC, MA Martínez Díaz, O Dochi, Y Takahashi. 2001. Factors affecting enucleation rate of bovine and porcine oocytes after removal of cumulus cells by vortexing. *J Reprod Dev* 47, 365-371.

- Brophy B, G Smolenski, T Wheeler, D Wells, P L'Huillier, G Laible. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol* 21, 157-162.
- Campbell KH, PLoi, PJ Otaegui, I Wilmut. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1, 40-46.
- Daniels R, V Hall, AO Trounson. 2000. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* 63, 1034-1040.
- Daniels R, VJ Hall, AJ French, NA Korfiatis, AO Trounson. 2001. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol Reprod Dev* 60, 281-288.
- Farin PW, JA Piedrahita, CE Farin. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65, 178-191.
- Galli C, R Duchi, G Crotti, P Turini, N Ponderato, S Colleoni, I Lagutina, G Lazzari. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599-616.
- Hodges CA, SL Stice. 2003. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 1-81.
- Iguma LT, SF Lisauskas, EO Melo, MM Franco, I Pivato, GR Vianna, RV Sousa, MA Dode, FJ Aragao, EL Rech, R Rumpf. 2005. Development of bovine embryos reconstructed by nuclear transfer of transfected and non-transfected adult fibroblast cells. *Genet Mol Res* 31, 55-66.
- Kato Y, T Tani, Y Sotomaru, K Kurokawa, J Kato, H Doguchi, H Yasue, Y Tsunoda. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, 2095-2098.
- Kurome M, T Fujimura, H Murakami, Y Takahagi, N Wako, T Ochiai, K Miyazaki, H Nagashima. 2003. Comparison of electro-fusion and intracytoplasmic nuclear injection methods in pig cloning. *Cloning Stem Cells* 5, 367-378.
- Martínez Díaz MA y JE Correa. 2004. Activación artificial y cultivo *in vitro* de ovocitos bovinos partenogénéticos en preparación para clonación por transferencia nuclear (TN). *Resúmenes del XIII Congreso de Medicina Veterinaria*, Valdivia, Chile.
- Martínez Díaz MA, T Mori, M Nagano, S Katagiri, Y Takahashi. 2003. Effect of fusion/activation protocol on in vitro development of porcine nuclear transfer embryos constructed with foreign gene-transfected fetal fibroblasts. *J Vet Med Sci* 65, 989-994.
- Takahashi Y, NL First. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978.
- Tamada H y N Kikyo. 2004. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet Genome Res* 105, 285-291.
- Tian XC, C Kubota, B Enright, X Yang. 2003. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer: biological factors. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 1-98.
- Vignon X, P Chesne, D Le Bourhis, JE Flechon, Y Heyman, JP Renard. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C R Acad Sci III* 321, 735-745.
- Wall RJ, AM Powell, MJ Pape, DE Kerr, DD Bannerman, VG Pursel, KD Wells, N Talbot, HW Hawk. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. *Nat Biotechnol* 23, 445-451.
- Wells DN. 2005. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech*. 24, 251-264.
- Wilmut I, AE Schnieke, J McWhir, AJ Kind, KH Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wrenzycki C, D Herrmann, A Lucas-Hahn, E Lemme, K Korsawe, H Niemann. 2004. Gene expression patterns-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci* 82-83, 593-603.