

Clonación de ovocitos y producción de hemiclones bovinos

Gabriel Vichera, Daniel Salamone

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de agronomía, UBA.
Reproducción 2007;22:108-117

Resumen

En este trabajo se desarrolló un método de generación de múltiples copias idénticas del núcleo de un ovocito; para luego reconstruir por transferencia nuclear, embriones con la misma información genética femenina (hemiclones). Para ello, ovocitos bovinos madurados *in-vitro* fueron activados partenogénicamente en forma haploide, utilizando ionoimicina (Io) 5 μ M por 4 min seguida de: a) 1,9 mM 6-DMAP; b) 25 μ M roscovitina; c) 5 μ M dehidroleucodina, por 3 h; o d) cicloheximida 10 μ g/ml por 5 h. Luego los embriones fueron cultivados durante 7 días. Un grupo de cada tratamiento se arrestó en metafase y se determinó su ploidía por tinción con giemsa ($n=68$). En un último experimento se seleccionaron los tratamientos Io + dehidroleucodina y Io + roscovitina para generar blastómeras haploides donantes de núcleos. Como recipientes se utilizaron cigotos a los que se les retiró el núcleo materno por micromanipulación. Las blastómeras donantes fueron transferidas al espacio perivitelino de los recipientes, electrofusionados y cultivados durante 6 días. En el primer experimento todos los tratamientos generaron partenogotas haploides; a) 67%, b) 83%, c) 83% y d) 63%, los cuales desarrollaron hasta estadio de mórulas-blastocistos. El desarrollo resultante de los hemiclones producidos por transferencia de blastómeras, arrojó un clivaje de 62,5 % y 54 %, y un porcentaje de mórulas de 25 % y 15 %, para el tratamiento Io + roscovitina

y Io + dehidroleucodina respectivamente. En resumen, utilizando esta técnica se podrían obtener múltiples copias del núcleo de un ovocito, eventualmente analizarlos cromosómicamente y utilizar los normales para reconstituir embriones, brindando de esta forma una alternativa ética al descarte embrionario.

Oocyte cloning and hemiclone embryo production in bovines

Summary

In this work we have developed a method to generate multiple identical copies of the nucleus of an oocytes, in order to reconstruct, by nuclear transfer, embryos with the same female genetic information (hemiclone). For this, *in-vitro* matured bovine oocytes were activated using an haploid parthenogenetic protocol consisting of initial treatment with Ionoimicine (Io) 5 μ M for 3 min followed by: a) 1,9 mM 6-DMAP, b) 25 μ M roscovitine, c) 5 μ M dehidroleucodine; for 3 h or d) 10 μ g/ml cycloheximide for 5 h. Then, embryos were cultured for seven days. In each treatment, a group of embryos were arrested at metaphase and their ploidy was determined by the giemsa staining method ($n=68$). In a final experiment, the treatments Io + roscovitine and Io + dehidroleucodine were used to produce haploid blastomeres which became nuclei donors. Zygotes produced by *in-vitro* fertilization were used as recipients after removing their maternal nucleus by micromanipulation. Donor blastomeres were introduced into the periviteline space of the recipients and electrofused. The reconstructed

Correspondencia: Gabriel Vichera
E-mail: gvichera@hotmail.com

embryos (Hemiclones) were cultured for 6 days. In the first experiment all the treatments generated haploid parthenotes, a) 67%, b) 83%, c) 83% and d) 63%, that developed to the morulae or blastocyst stage. The cleavage rates of hemiclones produced by transfer of blastomeres were 62.5 % and 54 % and the percentage of morulae, 25 % and 15 %, for the treatment Io + roscovitine and Io + dehidroleucodine respectively. We conclude that this technique is able to produce manifold copies of the nucleus of an oocyte and also that embryos can be reconstructed using these copies as nuclei donors. We propose that Hemicloning could be used in the future to analyze chromosomally each parthenote and to select only the healthy ones to reconstitute full embryos, providing an ethical alternative to embryonic discard.

Introducción

Algunas técnicas como la transferencia nuclear pueden ofrecer una opción de tratamiento para algunas parejas infértiles, particularmente en los casos de infertilidad relacionados con la edad.

El efecto del envejecimiento del ovocito en la implantación está relacionado con el incremento en la incidencia de aneuploidías y el estado anormal de la placa meiótica (Hassold y col; 2001).

La segregación de los cromosomas está controlada por el uso meiótico, pero sus componentes son suplementados en gran parte por el ovoplasma. Por lo tanto, se ha sugerido que factores ovoplásmicos no funcionales son los responsables de las anomalías estructurales del uso que liderarían finalmente a una segregación anómala de los cromosomas.

La utilización de un ovoplasma joven podría ser un modo de evitar formaciones anormales del uso meiótico. Sin embargo, uno de los factores limitantes más impor-

tantes para esta utilidad es claramente la disponibilidad de ovocitos, ya que los pacientes que podrían beneficiarse de estas técnicas también poseen un bajo número de ovocitos.

En este trabajo se plantea la posibilidad de aumentar la cantidad de embriones producidos *in-vitro*, a partir de una paciente de particular interés, mediante el desarrollo de un método completamente innovador de replicación del núcleo de un ovocito. La partenogénesis se define como el desarrollo embrionario a partir de una gameta femenina y sin aporte masculino. En el caso de los mamíferos estos embriones carecen de capacidad de desarrollo hasta estado adulto.

Tras obtener este embrión en el cual todas sus blastómeras poseen idéntica información genética y una dotación haploide de cromosomas, se realizaron transferencias nucleares utilizando cada una de estas blastómeras como célula donante de núcleo y empleando como recipientes ovocitos fecundados a los cuales se les eliminó el núcleo femenino.

Materiales y métodos

Ovocitos bovinos madurados *in-vitro* durante 24 hs fueron activados partenogénicamente en forma haploide utilizando diferentes tratamientos. Luego estos embriones fueron cultivados durante siete días, arrestando un grupo de cada tratamiento en metafase para determinar su ploidía por tinción con giemsa (n=68). En un último experimento se seleccionaron 2 de los tratamientos para generar blastómeras haploides donantes de núcleos y como recipientes se utilizaron cigotos a los que se les retiró el núcleo materno por micromanipulación. Las blastómeras donantes fueron transferidas al espacio perivitelino de los recipien-

tes, electrofusionados y cultivados durante 6 días.

Colección y maduración *in-vitro* de ovocitos

Los ovarios bovinos fueron obtenidos de matadero y llevados al laboratorio en solución fisiológica a 30° C. Para extraer los complejos ovocito-células del cúmulus (COCs) se punzaron los folículos de entre 2 y 5 mm con aguja 18 G. Finalizada la punción se seleccionaron bajo lupa estereoscópica aquellos COCs completamente rodeados por cúmulus compacto, de varias capas y citoplasma homogéneo en los ovocitos. Los ovocitos se maduraron *in-vitro* en medio TCM-199 suplementado con 5% SFB, 2% ATB y 20 ug/ml de Hormona Folículo Estimulante, a 39 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ durante un período de 22-24 Hs.

Activación partenogénica haploide

Los ovocitos maduros se retiraron de las gotas de maduración y se colocaron en un tubo plástico de 15 ml con 200 µl de solución Hialuronidasa (1mg/ml PBS), incubada previamente a 37°C (Denudación del cúmulus). Se sometieron los COCs a la acción del vortex durante 3-4 minutos. Se traspasaron todos los ovocitos a una placa de lavado con PBS o TL-H. Se transfirieron todos los ovocitos a una placa de petri de 36 mm con 3ml de TL-H y 4 µl de Ionomicina, resguardada de la luz durante 4 minutos. Luego de la incubación con ionomicina, se realizan lavados en TL-H o PBS. Tras realizar los lavados se sometieron los ovocitos a los siguientes tratamientos:

1) TCM-199 durante 3 hs + 6-DMAP 1,9 mM en medio TCM-199 por 3 hs.

2) TCM-199 durante 3 hs + Roscovitina 25 µM en medio TCM-199 por 3 hs.

3) TCM-199 durante 3 hs + DhL 5 µM en medio TCM-199 durante 3 hs.

4) Cicloheximida 10 µg/ml en medio TCM-199 durante 5 hs.

Finalizados los tratamientos de activación se realizó un lavado en TL-H con 2% SFB y luego un segundo lavado en TCM-199 estabilizado.

Cultivo embrionario

Los embriones se co-cultivaron con células del cúmulus en gotas de 100 µl de medio TCM-199 suplementado con 5% SFB y 2% ATB/ATM bajo aceite mineral a 39°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Determinación del número de cromosomas de las blastómeras

Para determinar el número de cromosomas de cada blastómera se cultivaron embriones en estadio de 4, 8 ó 16 células, durante 24 Hs en medio TCM-199 suplementado con Vincristina 1 µg/ml. Las blastómeras de los embriones se separaron utilizando Pronasa y posteriormente se realizaron tinciones cromosómicas con Giemsa al 5% v/v, tras exponer las blastómeras a un medio hipotónico (Citrato de Na 1% P/V) a 37 °C durante 15 minutos. La fijación se realizó utilizando Etanol 100%-Ácido Acético glacial 3:1. Para contar cromosomas se observó a un aumento de 40x y 100x.

Fecundación *in-vitro* (FIV)

Se descongeló el semen depositando las pajuelas en un recipiente con agua a 35°C. Se utilizaron para cada experimento 3 pajuelas de 0.5 ml. Se colocó 1 a 1.5 ml de semen en un tubo de 15 ml, el cual contenía 5 ml de solución SWS y se centrifugó a 490 g durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante y se agregó nuevamente 5 ml

de solución para lavado de semen SWS. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación durante 5 minutos a 490 g. Se removió el sobrenadante y se adicionó 0,5 ml de solución BO de lavado. Se ajustó el número de espermatozoides a 15 millones/ml de concentración final, adicionando solución SDS previamente calibrada. Se prepararon microgotas de 100 μ l de semen diluido en placas de petri de 36 mm y se coincubó con 30 ovocitos por gota, durante 4 h en estufa gaseada con 5% CO₂.

Tras finalizar las 4 hs de cocultivo se retiraron los ovocitos de las gotas de semen, se introdujeron en un tubo falcon de 15 ml y se sometieron a la acción del vortex durante 2 minutos para retirar todos los espermatozoides que no hayan penetrado la zona pelúcida del ovocito. Finalizada la FIV y previo a depositar los ovocitos fecundados en el medio de desarrollo embrionario, se realizó un lavado en TCM-199 estabilizado.

Enucleación del ovocito fecundado receptor

La enucleación de la metafase femenina se realizó por microcirugía utilizando un sistema de micromanipulación de dos brazos (Nikon-Narishige) acoplado a un microscopio invertido *Nikon* modelo *Eclipse Diaphot TE-300*. Para observar la metafase, se realizó una tinción con el colorante vital Hoechst 33342 en medio TCM 199 (1 μ g/ml) durante un período de 10 minutos a 39°C en estufa gaseada. La observación se realizó empleando luz ultravioleta en un microscopio de epifluorescencia, por un período menor a 10 segundos.

Preparación de la célula donante

Los tratamientos Io + dehidroleucodina y Io + roscovitina fueron seleccio-

nados para generar las blastómeras haploides donantes de núcleos. Se tomaron los embriones partenogénicos con carga cromosómica haploide y se transfirieron a una placa de Petri con 3 ml de TL-H y Pronasa 15 X al 10%, para retirar de esta forma la zona pelúcida de los embriones. Luego las blastómeras de los embriones fueron separadas utilizando una micropipeta. Finalmente, cada una de estas blastómeras fue utilizada como célula donante de núcleo.

Transplante nuclear

Ovocitos fecundados y enucleados de su metafase femenina fueron utilizados como recipientes. Una vez enucleados se les incorporó por micromanipulación el blastómero haploide completo, debajo de la zona pelúcida.

Fusión

El procedimiento de fusión consistió en la alineación manual del embrión en la cámara de fusión de manera tal que ambas superficies a fusionar estuvieron paralelas a los electrodos. La fusión fue iniciada por la administración de un pulso eléctrico de 120 v durante 30 μ s (*electroporation system* ECM 830).

Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos fueron cargados en el programa *Graph Pad PRISM*® versión 2.01 y se realizó el análisis no paramétrico de Chi Cuadrado entre columnas o Fisher, dependiendo el caso, utilizando un intervalo de confianza de 95%. Se consideraron significativas las muestras con un valor P < 0,05. Los desvíos estándar se determinaron en planillas de cálculo de *Microsoft Excel 2000*.

Figura 1. Representación esquemática de la clonación de ovocitos para producción de hemiclones.

