

Preñez obtenida en el país a partir de ovocitos caprinos clonados

Por Daniel Salamone¹ y Alejandro Gibbons²

La obtención de la primera preñez a partir de un embrión caprino clonado en la Argentina, lograda con ovocitos recuperados por laparoscopia inyectados con núcleos de células adultas, abre la posibilidad de seguir desarrollando esta metodología para generar animales clonados como base de la futura producción de cabras transgénicas. El Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Agronomía de la UBA y el Grupo de Reproducción del INTA Bariloche trabajan conjuntamente en este proyecto.

El advenimiento de las nuevas biotecnologías reproductivas ha permitido el nacimiento de la oveja Dolly, el primer rumiante nacido por clonación a partir de células somáticas adultas en 1997 y dos años más tarde la obtención del primer clon caprino por transferencia nuclear de células somáticas fetales. El nacimiento de animales clonados y transgénicos posibilitó incluir modificaciones genéticas en los mismos, orientadas a obtener -por ejemplo- proteínas recombinantes de interés farmacológico expresadas en leche de cabra, como la

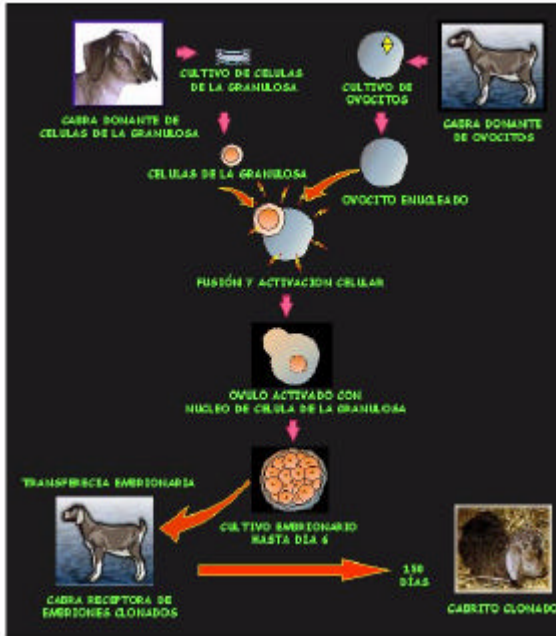
antitrombina III humana o la resistencia a una enfermedad tan importante para el ovino como el scrapie. A su vez, la clonación con células somáticas podrá ser utilizada para generar copias de animales de alto valor genético y contribuir a la preservación de animales en peligro de extinción. Adicionalmente permitirá incrementar los conocimientos sobre la función de los genes, reprogramación genómica, regulación del desarrollo, enfermedades genéticas y terapia génica.

¹ Lab. Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Bariloche, CC 277 (8400) Bariloche, Argentina.
agibbons@bariloche.inta.gov.ar

El trabajo fue realizado con financiación de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.
Participantes: M. Catala⁽¹⁾, F. Pereyra Bonnet⁽¹⁾, M. Cueto⁽²⁾, P. N. Naim⁽²⁾.

Figura 1. Representación esquemática del procedimiento de clonación y transferencia embrionaria.



La clonación consiste en lograr la reproducción asexual de un individuo a partir de la transferencia de un núcleo de una célula embrionaria, fetal o adulta, a un ovocito enucleado que ha madurado in vivo o in vitro y servirá como citoplasma receptor para la reprogramación nuclear (Figura 1).

Si bien en la actualidad es posible la obtención de embriones clonados, la gran limitante es que su desarrollo hasta el nacimiento y posterior sobrevivencia son muy bajos (0,5-3%). Los defectos fetales y placentarios, debido principalmente a los factores que afectan la reprogramación nuclear, se manifiestan con abortos tempranos o mortandad perinatal. Por tal motivo, las actuales líneas de investigación en clonación están siendo orientadas a elevar la baja eficiencia de las técnicas de producción de embriones clonados. Los procedimientos incluyen diversos métodos de colecta y maduración de ovocitos, transferencia nuclear con distintos tipos de células embrionarias y somáticas, y su posterior cultivo hasta alcanzar el estadio embrionario para ser transferidos a una hembra receptora.

En base a la necesidad de disponer a nivel nacional de la tecnología de clonación en rumiantes menores, el Grupo de Reproducción del INTA Bariloche y el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Agronomía de la UBA, realizaron la evaluación de una metodología para lograr embriones clonados caprinos a partir de ovocitos obtenidos por laparoscopia.

Ventajas y limitaciones de la técnica

La mayor demanda de ovocitos para ser utilizados en la producción de embriones clonados en caprinos incentivó a desarrollar la técnica de recuperación de ovocitos en donantes vivas por medio de laparoscopia (ROL). Su utilidad se basa en que se conoce el nivel sanitario del animal donante, a diferencia de los ovocitos obtenidos de ovarios de matadero, y asimismo se posibilita la realización de tratamientos hormonales para mejorar la cantidad y calidad ovocitaria. La ROL también permite la obtención de ovocitos en hembras con problemas de fertilidad, en períodos de gestación, anestro y prepúberes. Es una técnica rápida (20 minutos por animal) y menos invasiva que la laparotomía, permitiendo su utilización reiterada (hasta 4 veces) sin generar daño ovárico o disminución en la fecundidad de las donantes.

No obstante, la técnica presenta aún una amplia variación en sus resultados debido a que está supeditada a aspectos instrumentales y metodológicos. Ambos no están totalmente bien establecidos, siendo tema de discusión el régimen de aplicación de los tratamientos hormonales para estimulación del desarrollo folicular, dosis según razas, tiempo entre estimulación hormonal y punción folicular, dependiendo a su vez de la pericia del operador. Cada sesión de ROL permite obtener entre 4 y 10 ovocitos por hembra donante, con una tasa de recuperación ovocitaria del 33 al 87%.

El ensayo

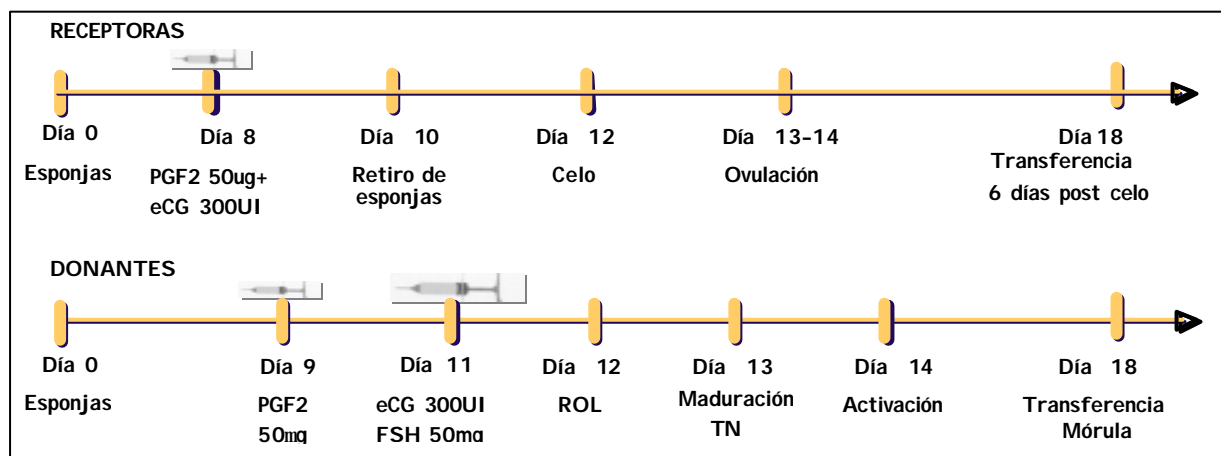
Para la obtención laparoscópica de ovocitos se utilizaron 63 cabras criollas, cuyos celos fueron sincronizados con prostaglandinas y esponjas intravaginales impregnadas con acetato de medroxi-progesterona, a las que se hizo una estimulación del desarrollo folicular con FSH y eCG con una única dosis 36 hs antes de cada ROL (Figura 2). Los ovocitos recuperados por aspiración (Figura 3) fueron madurados en el laboratorio durante 20 hs. Luego de la maduración (metafase II), los ovocitos seleccionados fueron teñidos con Hoescht 33342 y posteriormente enucleados mediante un micromanipulador bajo visualización con luz UV y microinyectados con núcleos de células de la granulosa (Figura 4). Los ovocitos clonados fueron cultivados en condiciones de laboratorio y aquéllos que alcanzaron el estado de mórula, fueron

envasados en pajuelas para ser transferidos a hembras receptoras.

Las receptoras fueron previamente sincronizadas mediante esponjas intravaginales, prostaglandina y eCG (Figura 2). La transferencia de embriones fue llevada a cabo bajo observación laparoscópica a los seis días post celo de las cabras receptoras. La siembra se realizó en el cuerno uterino ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo. Posteriormente, se realizaron ecografías para el diagnóstico de preñez a partir de los 30 días de edad gestacional.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos durante el período de ensayos comprendido entre los meses de mayo y agosto de 2005. Los resultados indican que los tratamientos y técnicas para la ROL, maduración, transferencia nuclear y cultivo in vitro empleados posibilitaron la producción de embriones caprinos clonados.

Figura 2. Tratamiento de estimulación hormonal para el desarrollo folicular y de sincronización estral para la transferencia de embriones clonados en caprinos.



Esponjas de medroxiprogesterona (MAP, Syntex, Arg). **PGF2** (Prostaglandina) (Glandinex®, Lab. Gramón, Arg.). **FSH-P1** (Folltropin®-V, Bioniche, Canada). **eCG** (Novormon 5000®, Syntex, Arg.). **ROL** (Recuperación Ovocitaria por Laparoscopia). **TN** (Transferencia Nuclear).

Tabla 1. Resultados obtenidos en la producción y transferencia de embriones clonados caprinos utilizando núcleos de células de granulosa.

Ovocitos recuperados por ROL	Ovocitos clonados* (%)	Ovocitos clivados (%)	Embriones transferidos** (%)	Hembras receptoras	Preñeces logradas*** (%)
574	150 (26)	80 (53)	28 (18.6)	11	1 (3.5)

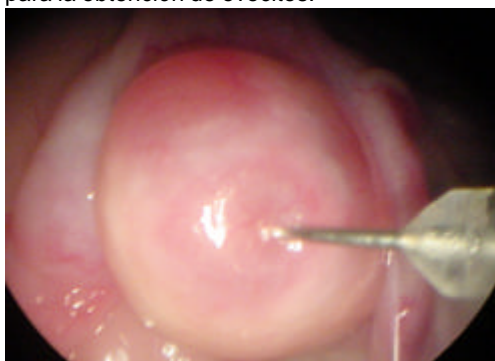
* Se consideraron los ovocitos en Metafase II y que no hubieran sido dañados por la micromanipulación.

** Embriones transferidos / ovocitos clonados.

*** Preñez lograda / embriones transferidos.

La preñez alcanzó el desarrollo embrionario hasta los 40 días de edad gestacional.

Figura 3. Punción folicular por laparoscopia para la obtención de ovocitos.



Haber obtenido la primera preñez de un embrión clonado con ovocitos recuperados por laparoscopia en la especie caprina en Argentina, brinda la posibilidad de seguir

desarrollando esta metodología a fin de lograr nacimientos de cabras clonadas como base de la futura producción de cabras transgénicas. Cabe considerar que este trabajo fue realizado con células adultas, a partir de las cuales es más difícil producir crías viables respecto al empleo de células fetales como donantes de núcleos. Los progresos que se logren en las técnicas para la obtención de ovocitos, protocolos de estimulación ovárica mediante hormonas gonadotróficas, desarrollo de medios más eficientes de maduración ovocitaria, procesos de clonación, cultivo de embriones clonados y en los estudios sobre reprogramación nuclear, permitirán incrementar la eficiencia de esta biotecnología reproductiva.

Figura 4. Proceso de transferencia nuclear (TN): (1) Enucleación ovocitaria (2) Colecta de células de la granulosa (3) Transferencia nuclear al espacio perivitelino de los ovocitos enucleados.

