ITEA (2003), Vol. Extra N.º 24. Tomo I, 282-284

# PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE BUCARDO (*Capra pyrenaica pyrenaica*) MEDIANTE CLONACIÓN POR TRANSFERENCIA NUCLEAR DE FIBROBLASTOS A OOCITOS DE CABRA DOMÉSTICA (*Capra hircus*).

Folch[1] J, Cocero[2] MJ, Chesné[3] P, Aguilar[1] B, Domínguez[2] V, Cognié[4] Y, Alabart[1] JL, Roche[1] A, Garbayo[1] A, Fernández-Arias[1] A, Echegoyen[1] E, Sánchez[1] P, Martí[1] JI, González de Bulnes[2] A, García-García[2] RM, Veiga-López[2] A, Vignon[3] X

[1]Unidad de Tecn. en Prod. Animal. SIA- Apdo 727, 50080 Zaragoza
[2]Área Reprod. Animal. SGIT/INIA. Ctra. de La Coruña Km 5.9, 8111 Madrid
[3]Biologie du Dévelop. et Reprod. INRA 78352 Jouy-en-Josas Cedex (Francia)
[4]Station de Physiologie de la Reproduction INRA 37380 Nouzilly (Francia)

## INTRODUCCIÓN

En casos extremos de razas en alto riesgo de extinción, la clonación puede suponer la única alternativa de reproducción. Este es el caso del bucardo, subespecie de cabra montés recientemente extinguida de la que sólo se dispone de unas líneas celulares somáticas congeladas, obtenidas a partir de una muestra de piel procedente de la última hembra viva.

Se han clonado con éxito cabras domésticas (Baguisi et al., 1999; Keefer et al. 2002) y existen algunos casos de clonaciones interespecíficas, como la del argali (*Ovis ammon*) o el muflón (*Ovis orientalis musimon*), utilizando oveja doméstica (*Ovis aries*) como receptora (White et al., 1999; Loi et al., 2001). El fundamento de la clonación reside en lograr la reprogramación del núcleo diploide de una célula somática. Se conoce ya la influencia de varios factores en la eficacia de la producción de embriones clónicos mediante transferencia nuclear (revisado por Renard et al., 2002). Se han realizado estudios sobre activación de oocitos, coordinación del ciclo celular entre el carioplasto y el citoplasto, métodos de fusión entre la célula somática y el citoplasto receptor, e incluso sobre el cultivo de los embriones reconstruidos, su transferencia, la gestación y parto (Campbell et al., 1993; Wilmut et al., 1997).

En esta comunicación se exponen los trabajos enfocados a reproducir al bucardo por clonación interespecífica y los primeros resultados obtenidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La experiencia se realizó en otoño de 2002, en el SIA de Zaragoza. Los animales se dividieron en 3 lotes de donadoras de oocitos (D1, D2, D3; 3 días de trabajo) y sus correspondientes grupos de receptoras de embriones.

**Producción de oocitos:** Se utilizaron oocitos madurados in vivo procedentes de 30 cabras domésticas adultas superovuladas, sincronizadas durante 11 días con esponjas de FGA de 45 mg (Intervet). La superovulación se realizó con 16 mg de pFSH, aplicados en dosis decrecientes (4, 4, 2, 2, 2 y 2 mg) a intervalos de 12h y 2 inyecciones de 66 µg de pLH, coincidiendo con la 5ª y 6ª inyecciones. Las gonadotropinas fueron cedidas por JF Beckers (Facultad de Veterinaria de Lieja). En la 1ª inyección se aplicaron también 0.3 ml de Cloprostenol (Estrumate). La retirada de esponjas coincidió con la 5ª inyección. Con el fin de provocar y sincronizar las ovulaciones, se aplicaron 50 µg de GnRH (Sigma) 32h tras retirar las esponjas. La recogida de oocitos se realizó a partir de las 28h de la inyección de GnRH (Baril y Cognié, Com. Pers.). Los oocitos se recuperaron lavando los oviductos con PBS, a través de una laparotomía ventral, bajo anestesia general.

Inmediatamente después de la extracción, los oocitos fueron aislados y conservados a 30ºC en M199 + 10% de suero fetal bovino (FCS), en ambiente de 5% de $CO_2$, hasta la enucleación. Algunos oocitos que aún mantenían células del cúmulus fueron denudados con hialuronidasa durante 5 min, seguido de pipeteado. Todas las manipulaciones se realizaron en M199-HEPES (20 mM) suplementado con 10% FCS, a temperatura ambiente

**Generación de carioplastos:** Los fibroblastos se obtuvieron de biopsias de piel y se cultivaron en medio DMEM y 10% de FCS (Vignon et al., 1998). Se utilizaron fibroblastos de tercer pase, previamente caracterizados por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra Vimentina. Las células se mantuvieron en confluencia durante 72h, antes de la transferencia nuclear.
**Transferencia nuclear:** Se efectuó en M199-HEPES en presencia de citocalasina B (Sigma C 6762, 5 µg/ml) y de Hoechst (0.5 µg/ml) para visualizar el núcleo metafásico del oocito. Cada oocito fue enucleado y a continuación se insertó una célula de origen fibroblástico, bajo la zona pelúcida, en el espacio perivitelino. Los conjuntos citoplasto-carioplasto se fusionaron mediante 2 pulsos eléctricos (Grass S48, Astro-Med Inc. USA) de 50 µsg, en manitol 0.3M+100 mM de Calcio y Magnesio. A continuación se incubaron en M199+10% FCS durante 2h y se activaron con 5 µM de Ionomicina (Sigma 10634), antes de ser incubados de nuevo en M199+10% FCS en presencia de 2 mM 6-DMAP (Sigma D 2629) y 5 µg/ml de citocalasina B, siguiendo la metodología descrita por Chesné et al. (2002). Los posibles embriones reconstruidos se cocultivaron con células VERO en Medio B2+2.5% FCS, a 39°C y 5% de $CO_2$, durante 36h ó 7 días.
**Transferencia de embriones:** Como receptoras se emplearon cabras montesas adultas (*Capra pyrenaica hispanica*) procedentes de la Reserva Nacional de caza de los Puertos de Tortosa y Beceite, por ser la población filogenéticamente más próxima al bucardo (Jiménez et al, 1999), o cabras cruzadas (F1; montés x doméstica). Las cabras se trataron con esponjas (FGA, 45 mg) durante 11 días. Cuarenta y ocho horas antes de retirar las esponjas, recibieron 400 UI de eCG y 0.2 ml de Cloprostenol (Estrumate). Una parte de los embriones reconstruidos se transfirió en el oviducto, utilizando una sonda Tom Cat, cuando estaban en estadio de 4 a 6 células (6 embriones/receptora), 72h tras la retirada de esponjas. Otra parte de los embriones se cultivó *in vitro* hasta los estadios de mórula compacta o de blastocisto para su trasferencia en útero, a los 7 días de la retirada de esponjas, utilizando también una sonda Tom Cat (3 embriones/receptora). Los embriones se transfirieron en el oviducto o en el cuerno uterino ipsilateral al ovario ovulado. El número de embriones transferidos estuvo condicionado por la disponibilidad de receptoras montesas o F1. Así, se realizaron 5 transferencias en oviducto (1 a montesas y 4 a F1) y 8 en útero (3 a montesas y 5 a F1).
**Diagnóstico de gestación:** A los 45 y 72 días de gestación, se realizaron ecografías externas a las hembras transferidas y se midió la concentración plasmática de PAG (González et al., 2000). Se realizaron observaciones diarias de celos, utilizando un macho vasectomizado cruzado (F1; montés x doméstica), hasta que se dispuso de los resultados de gestación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 30 donantes utilizadas se obtuvieron 285 oocitos, contabilizándose 387 cuerpos lúteos. Ello supone una tasa de recuperación del 73.6% y una media de 9.5 oocitos por donante.

| Lote | Nº emb. | Emb. div. a 36 h | Mor. + Blast. | Nº emb. Transf. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 4-6 cél. | M+B | Total |
| **D1** | 103 | 84 (81.5%) | 26 /91(28.6%) | 12 | 9 | 21 |
| **D2** | 130 | 87 (66.9%) | 36/118 (30.5%) | 12 | 9 | 21 |
| **D3** | 52 | 38 (73.1%) | 17/46 (36.9%) | 6 | 6 | 12 |
| **TOTAL** | **285** | **209 (73.3%)** | **79/255 (31.0%)** | **30** | **24** | **54** |

Se reconstruyeron 285 embriones. De ellos, 209 se habían dividido a las 36h de cultivo. Se transfirieron 30 embriones en estadio de 4-6 células. Los restantes 255 embriones se cultivaron durante 6.5 días y 79 de ellos alcanzaron el estadio de mórula compacta o blastocisto. En estos estadios se

transfirieron 24 embriones. El porcentaje de embriones obtenido a las 36h de cultivo fue del 73.3% y sólo un 31% de ellos llegaron a los estadios de mórula o blastocisto. Esta cifra es comparable a la obtenida en la clonación interespecífica del muflón (Loi et al., 2001), quienes lograron un 30.4% de blastocistos a 7 y 8 días de cultivo. En nuestro ensayo se utilizaron oocitos ovulados, para evitar las pérdidas debidas a una maduración subóptima, dado que la maduración *in vitro,* independientemente del procedimiento empleado, es uno de los mayores factores limitantes en la producción de embriones *in vitro* (Mermillod et al., 1999). Se ha indicado incluso, que después de la fertilización y cultivo *in vitro* en la cabra, el índice de desarrollo de los embriones hasta blastocisto es del 70% de los oocitos ovulados, mientras que el número de blastocistos se reduce al 50% cuando se utilizan oocitos madurados *in vitro*. (Cognie et al., 2003).

A los 45 días de gestación había 2 cabras híbridas gestantes (ecografía positiva y valores de PAG de 8 y 9 ng/ml; Progesterona: 3.1 y 1.1 ng/ml). En 3 receptoras se observaron imágenes ecográficas dudosas, con tasas de PAG y de Progesterona negativas (menores de 1 y de 0.3 ng/ml, respectivamente). No se vio en estos animales la presencia de celo. Las restantes se diagnosticaron como negativas. Estos datos indicarían la presencia de pseudogestaciones o muerte fetal sin expulsión antes de 45 días en algunas cabras. Ello no puede demostrarse ya que no se realizaron diagnósticos de gestación más tempranos para evitar abortos por estrés o traumáticos. Las 2 gestaciones se interrumpieron espontáneamente, dada la ausencia de PAG a 72 días.

Aunque es aún escaso el número de experiencias realizado hasta el momento y desafortunadamente se han perdido las gestaciones, el hecho de haber logrado embriones capaces de desarrollarse hasta blastocisto, e incluso el establecimiento de la gestación que se ha mantenido entre el día 45 y 72, confirma que el material biológico disponible de bucardo ofrece posibilidades para la recuperación de esta subespecie desaparecida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Baguisi A, Behbood E, Mellican DT (1999). Nature Biotec 17: 456-461.

Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I (1993). Biol Reprod. 49: 933-942.

Chesné P, Perreau C, Laloy E, Poulin N, Baril G, Bouttier A, Cognié Y, Vignon X, Heymann Y, Mermillod P (2002). 18e Réunion A.E.T.E- Rolduc. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P (2003). Theriogenology 59:171-188.

Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P (2003). Theriogenology 59:171-188.

Gonzalez F, Sulon J, Garbayo JM, Batista M, Cabrera F, Calero PO, Gracia A, Beckers JF (2000). Reprod Domest Anim 35(2): 79-82.

Jiménez N, Folch J, Fernández-Árias A, Guiral J, Sánchez A (1999). ITEA Vol. Extra 20 nº1: 300-302.

Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassare H, Karatzas CN (2002). Biol Reprod 66: 199-203.

Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M (2001). Nature Biotech. 19: 962-964.

Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y (1999). J Reprod Fertil 54:449-460.

Renard JP, Zhou Q, LeBourhis D, Chavatte-Palmer P, Hue I, Heyman Y, Vignon X (2002). Theriogenology 57, 203-222.

Vignon X, Chesné P, Bourhis DL, Fléchon JE, Heyman Y, Renard JP (1998). C R Acad Sci, Paris 321: 735-745.

White KL, Bunch TD, Mitalipov S, Reed WA (1999). Cloning 1: 47-54.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997). Nature 385: 810-813.



***Agradecimientos:*** *A JF Beckers y J Sulon (Univ. de Lieja) por la realización de los análisis de PAG.- Trabajo financiado por INIA (Proyecto RZ-01-023).*