OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS PARA SU UTILIZACIÓN COMO DONANTES GENÓMICOS EN TRANSFERENCIA NUCLEAR

V. Domínguez; A. González-Bulnes; RM. García-García; A. Veiga-López; MJ. Cocero.
Dpto. Reproducción Animal. INIA. Avda Puerta de Hierro s/n. 28040- Madrid

INTRODUCCIÓN

Aunque se cuenta con técnicas bien desarrolladas para cultivar y multiplicar distintos tipos celulares y están definidas las condiciones óptimas para su conservación mediante congelación (De Loecker et al, 1998), no se conoce qué tipos celulares son los más adecuados para la transferencia nuclear en oocitos (Kato y col., 2000); no obstante se dispone de información científica sobre las características que deben presentar el carioplasto y el citoplasto. Así, se ha publicado que las características ideales que debe reunir una célula, para ser una donante óptima para transferencia nuclear podrían resumirse en: ser relativamente indiferenciada, estar disponible en grandes cantidades y tener una fase G1 larga, que según los datos experimentales iniciales es la más apropiada para la transferencia nuclear, aunque recientemente se tiende a la sincronización en G0 (Vignon y col., 1998; Zou y col., 2002; Yu y col., 2003).

En 2001, se inició un Proyecto INIA con el objetivo de poner a punto la tecnología necesaria para la clonación en el género *Capra* y aplicarlo al Bucardo, subespecie de cabra montés extinguida, pero de la que se obtuvieron muestras de células del último animal antes de su muerte.

Son numerosos los factores que afectan al desarrollo de los embriones reconstruidos por transferencia nuclear (Campbell y col., 1993). En el presente trabajo se han evaluado características de las células somáticas que se eligieron como donantes genómicas, con el fin de determinar las mejores condiciones para la realización de las experiencias de transferencia nuclear con el material del bucardo:

- Tiempos de replicación y determinación de la densidad mínima de siembra.
- Evaluación de la morfología celular.
- Caracterización celular.
- Determinación del mantenimiento de una correcta dosis cromosómica.
- Inducción de G0.

Con el fin de preservar el material genético disponible del bucardo, las experiencias han sido realizadas a partir de una muestra de piel de la zona inguinal de cabra doméstica, *(Capra hircus)* utilizando la misma metodología que la ya aplicada para la creación de los cultivos de fibroblastos de bucardo *(Capra pyrenaica pyrenaica)*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de las muestras se anestesió una cabra doméstica adulta, se lavó y desinfectó la parte inferior del abdomen, se rasuró y se seccionó un área de 1cm^2. La muestra se introdujo en PBS + 4μL/ml de gentamicina (Sigma) y se transportó hasta el laboratorio, donde se hicieron explantes de 1mm^2 bajo la lupa con un bisturí. Estos explantes fueron introducidos en botes de cultivo Nunc (5-10 por F25) con SFB y 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma) durante dos días, momento en el que se les añadió medio de cultivo (DMEM (Gibco)+ 10% SFB + 2mM glutamina + 1% antibiótico-antimicótico). Las células fueron cultivadas en un incubador Heraeus a 38.5 °C, con una atmósfera del 95% de humedad, y un 5% de CO_2. Se realizaron cambios de medio cada 48-72h. Una vez que los cultivos llegaron a confluencia se tripsinizaron (5 minutos con tripsina-EDTA de Gibco) y las células se congelaron en SFB + 10% de DMSO

El primer paso, que fue el análisis de la morfología general, se efectuó sobre una muestra de las células crecidas, mediante tinción con azul de toluidina (AT). Previamente había sido efectuada una fijación de 10 minutos con metanol y posterior secado. Tras la tinción con AT al 0.05% durante 45 segundos, los cubreobjetos se lavaron y se montaron con DePex (Serva). Para la observación de la morfología nuclear se procesaron las células de la misma manera, pero para la tinción se utilizó Hoechst 33342 (Ho) 10μg/ml, durante 2 minutos.

La caracterización celular se realizó con técnicas de immunoflourescencia indirecta, usando dos anticuerpos: anti-citoqueratina KL1 (Biodesign), para marcar células epiteliales, y anti-vimentina V9 (Chemicon) para marcar células de origen mesenquimático (fibroblastos). Las células se fijaron en metanol frío durante 10 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron con el primer anticuerpo (1:100) 1h a 37ºC; después de tres lavados en PBS se post-incubó 1h a temperatura ambiente con el 2º anticuerpo (anti-mouse-FITC 1:300 de Chemicon) y volvieron a lavarse las preparaciones con PBS. El montaje de las preparaciones se hizo con mowiol (Sigma).

La determinación del cariotipo, se realizó sincronizando las células en mitosis con el inhibidor de la polimerización de los microtúbulos Colcemid® (Sigma). Para ello se incubaron las células con una concentración de Colcemid de 0.4μg/ml durante 4-6h; y posteriormente se despegaron las células en mitosis mediante un vórtex, se recogió el medio y se centrifugó a 1.000rpm durante 10 minutos, se resuspendió el pellet en citrato sódico 0.25mM y se incubó 20 minutos a 37ºC. Tras el choque hipotónico se fijaron las células con Carnoy. Para el recuento de cromosomas se utilizó el colorante azul de toluidina.

Para la sincronización de los cultivos en G0 se cambió el medio de cultivo habitual, que está suplementado con un 10% de SFB, por medio con un 0.5%. Se evaluaron 4 tiempos: 1, 3, 5 y 7 días, determinando el número de células muertas por apoptosis por tinción de las preparaciones con Hoechst.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación con el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo, se midieron tres parámetros: el tiempo de replicación de la célula, el número de pases tolerados, así como la evaluación de la morfología celular a lo largo de estos pases, y la densidad mínima de siembra, al hacer nuevos pases. En el caso de los fibroblastos, el tiempo de replicación de la célula fue de 18-20 horas. En la evaluación de la morfología celular, a lo largo de los sucesivos pases, observamos que no aparecían signos evidentes de degeneración en el cultivo hasta el pase 9-12, momento en el que se aprecia una cantidad notable de células binucleadas (6%-11.5%) y células con citoplasmas vacuolizados (7.4%-23.5%), que es una señal inequívoca de degeneración celular. En cuanto a la densidad mínima de resiembra, hemos adoptado las siguientes condiciones de trabajo: siembra: 20.000 células/cm^2, tripsinizaciones cada 72h (tiempo necesario para llegar a confluencia en nuestras condiciones de cultivo).

En la transferencia nuclear también es importante tener la seguridad del tipo celular con el que se trabaja, ya que son frecuentes las contaminaciones de diversos tipos celulares. En las experiencias del bucardo está prevista la utilización de fibroblastos; que es un tipo celular que a menudo coexiste con queratinocitos. Los resultados obtenidos en los cultivos de cabra doméstica, evidenciaron que en el tercer pase, el 100% de las células que permanecen en el cultivo son fibroblastos (células positivas con inmunofluorescencia a anti-vimentina), mientras las células epiteliales (queratinocitos, positivos a la inmunofluorescencia con citoqueratina), que eran sólo un 10% en el primer pase y 3-5% en el segundo, acaban por desaparecer a partir del tercer pase.

Con respecto al mantenimiento de la euploidía de un total de 40 metafases contadas de cada preparación hemos podido concluir, que hasta el pase número 7 los fibroblastos conservan la dosis cromosómica intacta. Dado que a partir del pase número 7 los signos de degeneración celular son evidentes, no se efectuó el estudio del mantenimiento de la dosis cromosómica en generaciones celulares sucesivas.

Numerosas publicaciones avalan la sincronización de las células donadoras en G0 como el mejor método para su utilización en la transferencia nuclear. En la bibliografía se utilizan dos métodos: la privación se suero en el cultivo (Yu y col., 2003) y el crecimiento hasta confluencia (Vignon y col., 1998). Nuestro equipo analizó el primer tipo, para ello se redujo la dosis de SFB en el cultivo de un 10% a un 0.5% y se analizó el porcentaje de muerte celular con tinción con Ho 1, 3, 5 y 7 días después del inicio de la privación. El porcentaje de apoptosis basal del cultivo fue del 1.2%; un día después del tratamiento no se observó diferencia, sin embargo a día 2 este porcentaje subió al 4%, el tercer día fue de un 5%, el quinto un 13% y a día 7 el porcentaje de células muertas por apoptosis fue de un 38%. Es importante señalar que estos porcentajes no sufrían variaciones dependiendo del pase del cultivo (se evaluaron los pases 2-7), así mismo hay que reseñar que las células no cesaron su ritmo de crecimiento habitual hasta el tercer día, lo que indica que hasta este momento no se producía la entrada en G0.

De los resultados expuestos podemos concluir que partiendo de fibroblastos adultos, aislados por el método de explantes, las mejores condiciones de trabajo para la transferencia nuclear, son entre los pases 3 y 6; así mismo, la inducción de G0 por privación de suero debiera hacerse por cultivo en estas condiciones durante 3 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campbell y col., 1993. *Nuclear-cytoplasmatic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implicatios for Deoxyribonucleid Acid replication and development.* Biology of Reproduction 49: 933-942.

- De Loecker et al, 1998. *Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation.* Cryobiology 37: 103-109.

- Kato y col., 2000. *Cloning of calves from various somatic cells types of male and female adult, newborn and fetal cows.* Journal of Reproduction and Fertility 20: 231-237.

- Vignon y col. 1998. *Developmental potential of bovine embryos reconstucted from enucleated matured oocytes fused cultured somatic cells.* C. R. Académie des Sciences, Paris 321: 735-745.

- Yu y col., 2003. *Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats: work in progress.* Theriogenology 59: 1277-1289.

- Zou y col., 2002. *Generation of cloned goats (Capra Hircus) from transfected foetal cells, the effect of donor cell cycle.* Molecular Reproduction and Development 61: 164-172.