ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 288-290

EXPRESIÓN DE VARIOS GENES IMPORTANTES PARA EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL EN BLASTOCISTOS OVINOS PRODUCIDOS IN VIVO E IN VITRO

J.M. Garbayo, A. Roche, B. Aguilar
Servicio de Investigación Agroalimentaria. Apdo 727, 50080 Zaragoza.
e-mail:jmgarbayo@aragob.es

INTRODUCCIÓN

El desarrollo preimplantacional depende de factores presentes en el ovocito, en forma de ARN y proteínas, hasta que se produce la activación del genoma embrionario (ZGA) y del subsiguiente mantenimiento de una transcripción zigótica apropiada, tanto espacial como temporalmente. En rumiantes, la ZGA está completada en el estadío de 8-16 células.

En gestaciones de embriones producidos in vitro se observa un elevado porcentaje de pérdidas embrionarias y fetales. También se ha descrito el síndrome de la descendencia grande, que provoca un mayor número de pérdidas en una fase temprana de la vida. Además, en bovino y ratón el cultivo in vitro de embriones preimplantacionales perturba el patrón coordinado de expresión génica necesario para un desarrollo normal y se ha sugerido que estas perturbaciones afectarían al desarrollo fetal, perinatal y a la vida adulta.

Entre los genes cuya expresión está afectada por el cultivo in vitro se encuentran algunos implicados en metabolismo, estabilidad del ARNm (ej. poli(A)polimerasa), stress (ej. Heat shock protein 70), mantenimiento de la compactación y cavitación (ej. Conexina 43), metilación (ej. DNA metiltransferasa 1), función placentaria, etc. (Niemann y Wrenzycki, 2000).

Los objetivos del presente trabajo consistían en la puesta a punto de la detección de tránscriptos de poli(A)polimerasa, Conexina 43, DNA metiltransferasa 1, y Heat shock protein 70 (Hsp70) y el estudio cualitativo de su expresión en blastocistos ovinos producidos in vivo e in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de embriones in vivo

Se superovularon 8 ovejas Rasa Aragonesa con FSHo (OVAGEN, ICP, New Zealand) mediante una bomba de infusión subcutánea permanente (GOTAGOT SL, patente europea nº9902484). La inseminación fue intrauterina complementada con cubrición natural. Los embriones se recuperaron 8 días y medio después de la retirada de esponjas según el método descrito por Ramon y col.,1991.

Producción de embriones in vitro

Los ovocitos, obtenidos a partir de ovarios de matadero, se maduraron en M199 suplementado con 1μg/ml de FSH porcina y 10% de fluido folicular durante 24h a 38,5ºC en atmósfera con 5%CO_2. Para la fecundación in vitro se utilizó semen fresco. Los espermatozoides, seleccionados por swim-up en mHTF, se capacitaron durante 3 h en SOF (sin BSA) suplementado con 10% de suero de oveja en celo y se incubaron con los ovocitos durante 20 h a 38,5ºC en atmósfera con 5%CO_2. Los embriones se cultivaron en microgotas de 20 μl de SOF + 0.3% BSA cubiertas por aceite mineral durante 7 días a 38,5ºC en atmósfera con 5%CO_2, 90%N_2 y 5% O_2.

En ambos casos sólo se utilizaron embriones de buena calidad morfológica, se lavaron 3 veces en PBS ó SOF, se congelaron inmediatamente en el mínimo volumen y se guardaron a –80ºC hasta la extracción del ARN.

Extracción de ARN total

A los embriones congelados se añadieron 500μl de TRI-REAGENT (Sigma) frío, se agitaron durante unos segundos para romper la zona pelúcida y membranas celulares y se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial. Para ayudar en la precipitación del ARN se añadió glucógeno

(Invitrogen, Life Technologies). El ARN se resuspendió en 6µl de agua bidestilada tratada con DEPC y se guardó a -80ºC, en presencia de inhibidores de ARNasas (RNaseOUT, Invitrogen) hasta su uso.

Transcripción inversa

Se realizó en un volumen total de 20µl utilizando el total del ARN extraído, durante 50m. a 42ºC. Se utilizaron 0.5µg de oligo dT (primer $p(DT)_{15}$, Roche) y 200U de transcriptasa inversa (Superscript II RNaseH$^-$, Invitrogen, Life Technologies) según el protocolo recomendado para el enzima. Una reacción paralela contenía agua en vez de ARN (ARN-) como control de contaminación externa durante la transcripción inversa. La contaminación genómica en el ARN se controló mediante RT-PCR con cebadores de β-actina que comprenden un intrón (Lequarre y col., 1997)

PCR

En reacciones de 25µl se utilizó, como molde, 1µl de la reacción de transcripción inversa, con 200µM de cada dNTP, cebadores diseñados utilizando secuencias conocidas (tabla 1) entre 0.250 y 0.365µM, dependiendo del gen y 0.5U de Taq polimerasa en tampón que contenía 2mM de Cl_2Mg (Biotools). Las reacciones consistieron en una desnaturalización inicial de 5m. a 94ºC, seguida de 40 ciclos (37 en el caso de DNMT1) consistentes en desnaturalización de 30s a 94ºC, anillamiento de 15s a 55ºC (hsp70), 57ºC (β-actina y poli(A)polimerasa), 59ºC (Conexina43) ó 60ºC (DNMT1) y extensión de 15s (excepto Conexina 43, 30s) a 72ºC. En todos los casos hubo un ciclo de extensión final de 5m a 72ºC.

Tabla 1. Cebadores utilizados para distintos genes y tamaño del fragmento amplificado.

	cebador derecho	**cebador reverso**	**tamaño fragmento**
β-actina	gcgtgacatcaaggagaagc	tggaaggtggacagcgaggc	432(ARN);643(ADN)
DNMT1	cgcatgggctaccagtgcacctt	gggctccccgttgtatgaaatct	312
poliApolimerasa	gtttcctcggtggtgtttcct	tggagttctgttgtgggtatgc	252
hsp70	aaggtgctggacaagtgccaggaggtga	acttggaagtaaacagaaacgggtgaaaaa	488
Conexina43	gggaaagagcgatccttaccacac	ccacctccaatgaaacaaaatgaacaccta	516

Los productos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (2-3%) en tampón TAE que contenía bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas y digitalizadas mediante el sistema Gel Doc 2000 (Bio Rad).

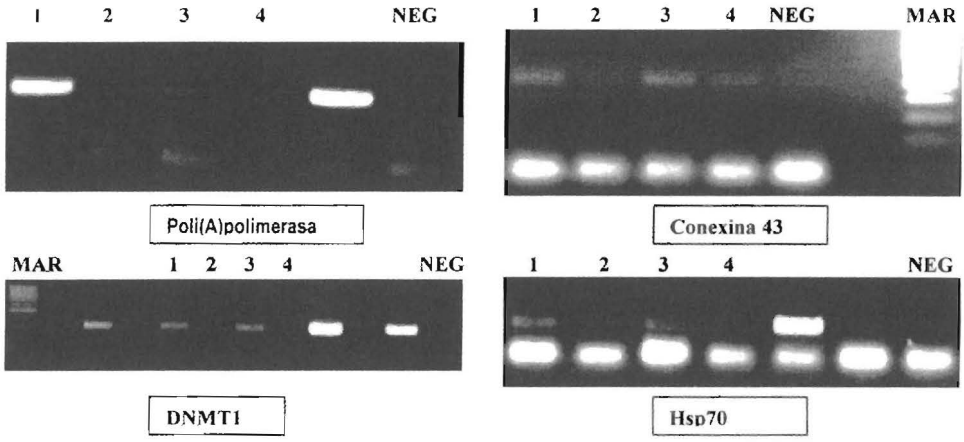
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 24 embriones in vivo (7 blastocistos expandidos y 17 eclosionados) y 10 embriones in vitro (1 blastocisto, 5 blastocistos expandidos, 3 en eclosión y 1 eclosionado), lo que supuso 1.2 y 0.5 equivalentes de embrion por cada microlitro de reacción de transcripción inversa in vivo e in vitro, respectivamente.

Tanto en blastocistos obtenidos in vivo como in vitro se detecta la expresión de β-actina, con una única banda de alrededor de 432bp (resultados no mostrados) que indican ausencia de contaminación genómica en el ARN.

Como se ve en la figura 1 los cebadores utilizados sirvieron para detectar un producto del tamaño esperado. En el caso de DNMT1 el producto de PCR se secuenció y la secuencia obtenida era un 89% idéntica a la DNMT1 humana. Se comprobó, por tanto, que todos los genes en estudio se expresan en blastos ovinos obtenidos tanto in vivo como in vitro, aunque no se pueden hacer comparaciones de nivel de transcripción, debido al diferente número y estadio de los embriones utilizados.

Figura 1. RT-PCR de los distintos genes en estudio.



MAR: marcador 100bp; NEG: negativo; 1: blastos in vivo RT+; 2: blastos in vivo RNA-; 3: blastos in vitro RT+; 4: blastos in vitro RNA-.

Todos estos tránscriptos habían sido detectados igualmente en blastocistos bovinos producidos in vivo e in vitro, y su nivel de transcripción estuvo afectado por el cultivo in vitro. Como caso extremo, no se detectó expresión de Conexina 43 en blastocistos producidos in vitro pero sí in vivo (Wrenzycki y col., 1996). En ovino no hemos observado un efecto cualitativo del cultivo in vitro en la expresión de Conexina 43. La discrepancia podría ser explicada por diferencias entre especies o bien por la utilización de medio SOF para el cultivo in vitro. En bovino el SOF produce un nivel de expresión génica más similar a lo que ocurre in vivo que el TCM (Wrenzycki y col., 2001). De todas maneras estos resultados son preliminares y deben ser confirmados.

La puesta a punto de la detección de expresión génica de los genes en estudio mediante el uso de secuencias conocidas demuestra la expresión génica de poliApolimerasa, Conexina 43, DNMT1 y Hsp70 en blastocistos ovinos obtenidos tanto in vivo como in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

Niemann, H y Wrenzycki, C. Theriogenology 53:21-34.2000.
Ramon, J.P. y col. ITEA, Vol. Extra, 11 (1), 61-63. 1991
Lequarre, AS y col. Mol. Reprod. Dev. 48:216-226. 1997.
Wrenzycki, C y col. J. Reprod. Fert. 108:17-24. 1996.
Wrenzycki, C y col. H. Human Reprod. 16:893-901. 2001.

Trabajo financiado por proyecto INIA RTA02-094.
Agradecimientos: Elias Echegoyen, Pilar Sánchez, Julio Olivera y José Ignacio Martí por su ayuda en el manejo de los animales.