

## **CLONACION DE VACAS ADULTAS POR TRANSFERENCIA NUCLEAR CON CELULAS DE LA GRANULOSA MURAL OVARICA**

### *Cloning of adult cows by nuclear transfer of ovarian mural granulosa cells*

Irina Lagutina<sup>1</sup>, Daniel Ponce<sup>2</sup>, Roberto Diaz<sup>3</sup>, Flor Castañeda<sup>3</sup>, Iván Mesía<sup>3</sup>, Cesare Galli<sup>1</sup> y William Vivanco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTO AVANTEA, Cremona, Italia.

<sup>2</sup> VIVANCO INTERNATIONAL SAC, Lima, Perú

<sup>3</sup> LABORATORIO SEMBRIO, LACTEA SA, Trujillo, Perú

\* Corresponding author

Daniel Ponce

E-mail: daniepos83@hotmail.com

#### **ABSTRACT**

The objective was cloning three adult cows using their ovarian mural granulosa cells collected by transvaginal ovum pick up (OPU). One group (T1) of granulosa cells were matured together with their oocytes as part of the COC (Cumulus Oocyte Complex), a second group (T2) were cultured for 3 days independently of their oocytes and a third (T3) group was collected from the cells that are shed during the filtration of the OPU aspirations. The oocytes were denuded and then enucleated after previous treatment with pronase to digest the zona pellucida. The reconstructs were subjected to electro fusion before the chemical activation with ionomycin. A total of 324 embryo reconstructs were obtained; 158 from T1, 45 from T2 and 121 from T3. The overall response to activation of the embryo reconstructs was 91.35% and there were no statistical differences ( $P>0.05$ ) between treatments. There were however significant differences ( $p<0.01$ ) in the cleavage percent and in the percent of transferable embryos obtained with the different types of granulosa cells; the cleavage rate was 70 %, 61.7 % y 41.7 % for T2, T1 and T3 respectively and the rate of transferable embryo production was 30 %, 13.5 % and 0.86 %, for T2, T1 and T3, respectively. Two clone calves were obtained, one from T2 and one from T3. The calf from T2 is normal and healthy, the calf from T3 showed a congenital defect (cardiac teratology) and died 3 days after birth. Our results confirm previous work that show that ovarian mural granulosa cells obtained from adult live cows can be reprogrammed successfully after being transferred by the nuclear transfer procedure to matured enucleated oocytes and produce live normal cloned calves; also shows that there is no difference in the activation efficiency between the different groups of granulosa cells used.

**Keywords:** Ovsynch,

#### **RESUMEN**

El objetivo fue la clonación de tres vacas adultas utilizando sus células de la granulosa mural ovárica colectadas por aspiración folicular transvaginal. Un grupo de células de la granulosa (T1) se maduraron junto con sus respectivos ovocitos del COC (Complejo cúmulo ovocito), otro grupo (T2) estuvo en cultivo celular por tres días independientemente del ovocito y un tercer grupo (T3) fue obtenido de la filtración de las colectas de aspiración folicular. Los ovocitos fueron denudados y luego enucleados previa digestión de la zona pelúcida con pronasa. Los reconstructos fueron sometidos a fusión eléctrica antes de la activación química con ionomicina. Se obtuvieron 324 embriones reconstruidos; 158 para el grupo T1, 45 para el grupo T2 y 121 para el grupo T3. Los reconstructos mostraron una alta respuesta a la activación (91.35%) sin diferencia significativa ( $P>0.05$ ) a la prueba de homogeneidad de Chi cuadrado entre los grupos; hubieron sin embargo diferencias altamente significativas ( $p<0.01$ ) entre tratamientos para la tasa de clivaje y la tasa de embriones transferibles, siendo 70 %, 61.7 % y 41.7 % de clivaje para T2, T1 y T3, respectivamente. La tasa de producción de embriones fue de 30 %, 13.5 % y 0.86 %, para T2, T1 y T3, respectivamente. Se lograron 2 clones nacidos, uno de T2 y otro de T3. La ternera clonada de T2 es normal y saludable, la ternera de T3 mostró un defecto congénito (teratología cardíaca) y murió a los 3 días de nacida. Los resultados confirman trabajos anteriores que demuestran que las células de la granulosa mural ovárica

obtenidas de vacas adultas vivas pueden ser reprogramadas exitosamente luego de ser transferidas por el proceso de transferencia nuclear a ovocitos maduros enucleados y producir terneras vivas y normales; también se demuestra que no hay diferencia en la eficiencia de activación de los reconstruidos cualesquiera que haya sido el tratamiento de las células de granulosa.

**Palabras clave:** Transferencia nuclear, clonación, células de granulosa, vacas.

## INTRODUCCION

En mamíferos, la clonación se realiza ya sea a nivel embrionario o una vez que el individuo esté desarrollado. Las técnicas usadas a nivel embrionario son la bipartición de embriones en que cada mitad embrionaria resultante de la bipartición desarrolla un embrión con el subsecuente nacimiento de crías gemelas idénticas (Vivanco et al., 1991; Vivanco y Greaney, 1992) o por transferencia nuclear de blastómeros (células embrionarias 2n) generando varios embriones a partir de un embrión, resultando al transferirlos en dos o más individuos genéticamente idénticos (Vivanco et al., 2000). La clonación de individuos (desde el estadio fetal en adelante) se hace mediante el proceso de transferencia nuclear similar al utilizado con blastómeros pero usando células somáticas reprogramadas. El procedimiento de transferencia nuclear consiste en reemplazar el núcleo de un ovocito (que tiene carga cromosómica "n", o sea la mitad del número de cromosomas de la especie) por una célula con carga cromosómica completa "2n" que puede ser un blastómero embrionario o una célula somática obtenida del individuo a ser clonado (Campbell et al., 1996; Wilmut et al. 1997; Wells et al., 1997, 1998, 1999, 1999a).

Entre los varios factores que determinan la tasa de éxito en la clonación de individuos por transferencia nuclear, la fuente de células somáticas usadas como núcleo para reemplazar el núcleo del ovocito enucleado es de mucha importancia ya que parece estar relacionado con su habilidad para reprogramarse y adquirir totipotencia completa (Stice et al., 1996; Cibelli et al., 1998).

La primera clonación exitosa (con nacimiento de ternera viable) en vacunos se efectuó en AgResearch, Nueva Zelanda (Wells et al; 1998) usando como fuente de célula somática las células de granulosa ovárica mural de la vaca a clonar; los embriones se construyeron usando ovocitos en metafase II enucleados y células de la granulosa mural ovárica en quiescencia; en ese estudio además de demostrar la viabilidad de las células de granulosa ovárica como núcleo para el proceso de transferencia nuclear, se determinó que hay un mejoramiento en la tasa de desarrollo de los embriones reconstruidos si se prolonga el tiempo de exposición de la célula somática quiescente usada como núcleo al citoplasma del ovocito antes de hacer la activación artificial posiblemente facilitando la reprogramación nuclear. El grupo de AgResearch, hizo subsecuentes clonaciones exitosas (Wells et al., 1998, 1999) usando células de la granulosa mural ovárica estableciéndose por lo tanto las células de granulosa como una fuente confiable para transferencia nuclear.

El uso de células de la granulosa mural ovárica como núcleo en el proceso de clonación por transferencia nuclear tiene la ventaja de la facilidad de su obtención (simplemente por aspiración folicular). El presente estudio tuvo como objetivo determinar si las células de la granulosa mural ovárica podrían ser usadas como núcleo para la reconstrucción de embriones

por transferencia nuclear ya sea que se les someta a cultivo para generar una línea celular primaria o sean maduras conjuntamente con el ovocito como parte del COC (complejo ovocito-cúmulo), o simplemente sean cosechadas directamente de los filtros de lavado de COC luego de la aspiración folicular sin haber pasado por cultivo o maduración in vitro.

El estudio también tuvo como objetivo comparar dos alternativas de activación de los reconstruidos y demostrar la aplicabilidad de la clonación para preservar y difundir la genética de vacas de alto nivel productivo.

## MATERIALES Y METODOS

### *Selección de las vacas donantes:*

Como donantes de las células de granulosa ovárica se seleccionaron 3 vacas adultas (vaca N° 7441; vaca N° 6561 y vaca N° 2043) de alta producción de la raza Holstein Friesian del establo lechero de la compañía LACTEA SA en la localidad de Virú, Trujillo, Perú; las 3 vacas estuvieron en lactación al momento de obtener las muestras.

Los ovocitos utilizados para el proceso de transferencia nuclear fueron seleccionados para cada ronda de clonación del pool de COC colectados de vacas adultas Holstein Friesian del establo lechero de la compañía LACTEA SA que estaban siendo sometidas a colección rutinaria de ovocitos para la producción de embriones in vitro.

### *Obtención de las células de granulosa:*

Las células de granulosa ovárica mural se obtuvieron de los complejos ovocito-cúmulo (COC) colectados por aspiración folicular por el método transvaginal con ayuda ecosonográfica, de las 3 vacas donantes seleccionadas previamente; se aspiraron folículos de 3 a 10 mm de diámetro de los ovarios de las vacas donantes. Los COC fueron sometidos a tres diversos tratamientos antes de colectar las células de la granulosa:

a) *Maduración in vitro (Tratamiento 1):* Los COC obtenidos de las vacas 7441 y 2043 fueron sometidos a maduración in vitro por 18 a 24 horas en medio de cultivo TCM 199 suplementado con 10% FCS (suero fetal bovino), FSH y estrógeno e incubados a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de la maduración los COC fueron denudados mecánicamente recolectándose las células de la granulosa para ser usadas en la transferencia nuclear.

b) *Cultivo celular (Tratamiento 2):* Inmediatamente después de la aspiración folicular los COC de las vacas 7441 y 6561 fueron sometidos a denudación mecánica obteniéndose las células de granulosa las cuales fueron sembradas en platos de cultivo y cultivadas por tres días para establecer una línea primaria de células; la aspiración de los ovocitos y el filtrado se hizo en medio TCM 199 HEPES (H-199) conteniendo 50

ug/ml de heparina y 0.4% v/v de BSA. Luego los ovocitos fueron enjuagados en medio H-199 + 10% FCS y sometidos a denudación, las células de granulosa obtenidas de la denudación se enjuagaron en H-199 + 10% FCS y luego fueron sembradas en un plato de cuatro hoyos (NUCLON, Roskilde, Holanda) conteniendo medio DMEM/F12 (SIGMA D6421) suplementado con 10% (v/v) de FCS y piruvato de sodio a una concentración de 1mM y antibióticos a las siguientes concentraciones: 10 ul/ml de anfotericina B, penicilina 1,000 UI/ml y estreptomycin 1,000 microgramos/ml. Los platos fueron incubados en incubador de mezcla de gases a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub>. A los tres días de cultivo y habiéndose obtenido confluencia parcial se hizo la obtención de las células de granulosa cultivadas utilizándose una solución enzimática TEG conteniendo 0.25% v/v de TRIPSINA y 0.04% de EGTA (SIGMA enzymatic solution TEG) exponiendo las células de la mono capa confluyente por 7 minutos a 39°C, luego se enjuagaron en H-199 quedando listas para su conservación. La conservación de las células de granulosa luego del cultivo se hizo transfiriéndolas a medio de congelamiento constituido por: DMSO (Di metil sulfóxido) 10%, FCS 50% y medio SOFaa de cultivo de embriones 40%. Una vez re-suspendido en el medio de congelamiento se cargaron las células en frascos de congelamiento ("cryovials") y se colocaron dentro de una caja de polietileno en el congelador a -80° C. Para usarlas en la transferencia nuclear se descongelaron las células el mismo día de uso.

**c) Cosechadas directamente de los filtros de lavaje de COC luego de la aspiración folicular (Tratamiento 3):** la aspiración de los ovocitos y el filtrado de la vaca 6561 se hizo en medio TCM 199 HEPES (H-199) conteniendo 50 ug/ml de heparina y 0.4% v/v de BSA. Luego los ovocitos fueron enjuagados en medio H-199 + 10% FCS y sometidos a denudación, las células de granulosa obtenidas de la denudación se enjuagaron en H-199 + 10% FCS y fueron usadas para el proceso de transferencia nuclear sin ser sometidas a cultivo previo o maduración in vitro.

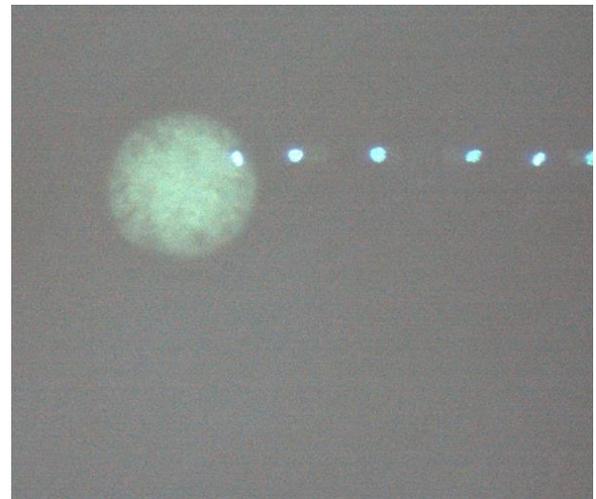
#### **Maduración in vitro y denudación de los ovocitos:**

Los COC para obtención de los ovocitos fueron colectados por aspiración folicular de vacas vivas sometidas a colección rutinaria en el establo de LACTEA SA. La aspiración de los COC y el filtrado se hizo en medio TCM 199 HEPES (H-199) conteniendo 50 ug/ml de heparina y 0.4% v/v de BSA. Luego los COC fueron enjuagados dos veces en medio H-199 + 10% FCS para luego ser sembrados en las placas de maduración conteniendo las gotas de medio de maduración (medio B-199+ 10% FCS + FSH+LH+Estradiol+ factores de crecimiento) previamente equilibradas. Las placas conteniendo los COC en medio de maduración fueron incubadas a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub> por 20 horas al cabo de las cuales se sacaron las placas del incubador y los COC se denudaron completamente de las células de granulosa utilizando un sacudidor VORTEX, para lo cual se transfieren los COC a un micro vial conteniendo HSOF con 0.1% v/v de hialuronidasa y se sacudieron por 3 minutos, luego se transfirieron sólo los ovocitos denudados a placas con HSOF + 10% FCS lavándose en este medio por 3 veces quedando así listos para ser enucleados.

#### **Enucleación de los ovocitos:**

Los ovocitos maduros fueron enucleados 20 a 22 horas post inicio de la maduración, se efectuó por aspiración del primer

cuerpo polar y el plato de la Metafase II (MII) con una pequeña cantidad de citoplasma circundante usando una pipeta de aspiración de 30 um de diámetro externo. Para hacer la enucleación los ovocitos fueron previamente sometidos a digestión de la zona pelúcida. Para remover la zona pelúcida los ovocitos en estadio de Metafase II se pusieron en una gota de 0.5% de Pronasa hasta que se observe la digestión visible de la zona pelúcida y luego se lavaron los ovocitos en H-SOF + 5% FCS, esperando hasta que los ovocitos recuperen su forma circular para luego pipetearlos suavemente para remover el cuerpo polar y los remanentes de material de la zona pelúcida, luego fueron teñidos en un medio compuesto de HSOF + 10% FCS, 5 ug/ml de tinta HOECHST 33342 y 7.5 ug/ml de Citocalasina B por 20 minutos. La enucleación se confirmó por la visualización bajo luz ultravioleta de cada carioplasto cuando estaban todavía dentro de la pipeta (fotografía 1). Luego de la enucleación, los citoplastos resultantes fueron lavados extensivamente en HSOF + 10% FCS y mantenidos en ese medio hasta la inyección de la célula donante.



**Figura 1.** Pipeta de aspiración succionando el carioplasto de un ovocito sin zona pelúcida y mostrando dentro de la pipeta 5 previos carioplastos ya succionados de otros ovocitos.

#### **La transferencia nuclear con células de la granulosa mural ovárica:**

Se usaron tres tipos de células de la granulosa (cultivadas por 3 días, maduras como parte de los COC y obtenidas directamente de los filtros de colección), en ninguno de los casos se indujo quiescencia, simplemente se obtuvieron las células de sus respectivos medios de cultivo o de conservación. Inmediatamente antes de ser usadas para la transferencia nuclear la respectiva suspensión de células de granulosa fue preparada por tripsinización estándar, centrifugada y resuspendida en HSOF + 0.5% FCS permaneciendo en este medio hasta su uso en la fusión.

En los comparativos realizados para clonar la vaca LADY en Nueva Zelanda (Wells et al. 1998) se encontró que hacer la fusión antes que la activación ("Fusion Before Activation", "FBA") daba mejores resultados confiriendo totipotencia a células no quiescentes y siendo que en este estudio no se indujo la quiescencia en ninguno de los grupos, se decidió por lo tanto

hacer la fusión antes que la activación. Para hacer la fusión antes de la activación los ovocitos maduros, los citoplastos y los embriones reconstruidos son mantenidos o manipulados en medios HSOF y SOF según corresponda, pero sin calcio desde después de la maduración y hasta 30 minutos antes de la activación (Wells et al., 1998).

#### Creación de los complejos citoplasto-célula donante:

Se aplicó el método libre de zona pelúcida (Lagutina et al., 2007), utilizando los citoplastos generados en el proceso de enucleación de ovocitos con zona pelúcida digerida y las células de granulosa de los tres tratamientos.

Para formar los complejos citoplasto-célula donante se utilizaron placas Petri de 4 hoyos, poniendo en el primer hoyo el medio de fusión, en el hoyo 2 el medio H-SOF y en el hoyo 3 el medio H-SOF + 10% FCS. En una placa Petri de 35 mm se colocó una gota de solución de lecitina. Todas las placas se cubrieron con aceite mineral. Las células de granulosa de donantes se colocaron en el hoyo 2 y los citoplastos en el hoyo 3. Los citoplastos en parejas fueron luego transferidos a la gota de lecitina lavándolos suavemente por 3 a 5 segundos luego de los cuales los citoplastos se transfirieron al hoyo 2 soltándolos sobre la célula de granulosa selecta rodándolo sobre la misma para que se peguen y que formen el complejo, luego el complejo se transfirió al hoyo número 1 conteniendo el medio tampón de fusión (solución conteniendo 0.3 M manitol, 0.5 mM HEPES y 0.05% FAF "fatty acid free" BSA "Bovine Serum Albumin") 0.05 mM Ca y 0.1 mM Mg.

#### Fusión citoplasto con célula donante

Se hizo fusión eléctrica utilizando una cámara de fusión y un generador de pulso eléctrico (ZOT2007, LPS Electronics, Italia). La fusión se hizo a temperatura ambiente en una cámara con 2 electrodos de aceros inoxidable separados a 500  $\mu$ m y cubiertos por el medio tampón de fusión.

Los embriones reconstruidos fueron alineados manualmente con una "mouth pipette" de tal manera que la superficie de contacto entre el citoplasto y la célula donante sea paralela a los electrodos.

La fusión celular fue inducida con 2 pulsos DC de 2.25 KV/cm por 15  $\mu$ s cada uno. Luego del estímulo eléctrico los embriones reconstruidos fueron lavados en HSOF + 10% FCS, inspeccionados para determinar si la fusión había ocurrido y mantenidos en HSOF + 10% FCS hasta su activación.

#### Activación

La activación se hizo después de la fusión.

Los platos para la activación fueron preparados 60 minutos antes de la activación y fueron equilibrados en un incubador a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub>.

La solución de activación usada tuvo la siguiente composición:

- Ionomicina (sigma I-0634) 1 mg en 1330  $\mu$ l de etanol absoluto.
- Medio de cultivo SOF para cultivo in vitro + 1  $\mu$ l/ml of cicloheximida 10  $\mu$ g/ $\mu$ l en etanol + 1  $\mu$ l/ml de citocalasina B + 10% FCS

- O 6 DMAP 2 mM en SOF y/o
- O 6 DMAP 1 mM en SOF + 0.5  $\mu$ l de cicloheximida 10  $\mu$ g/ $\mu$ l en etanol (en algunas corridas no se usó cicloheximida identificándose como una variación en la activación).

Se prepararon platos de activación con placas de 30 mm no tratadas para prevenir que se peguen los embriones sin zona al fondo de la placa haciendo gotas de 2-3  $\mu$ l de solución de activación cubiertas con aceite (1-2 reconstruidos por gota).

Una hora luego de la última fusión se prepararon los platos de 30 mm con 2 ml de H-SOF + 10% FCS y placas no tratadas para cultivo celular para evitar que los reconstruidos se peguen en el fondo).

Se tomó una alícuota de ionomicina del congelador de -80°C y se centrifugó a 3000 rpm y se preparó un plato no tratado de 30 mm con 1 ml de H-SOF y se le añadió 5  $\mu$ l de ionomicina. Inmediatamente se transfirieron los embriones clonados dentro del plato con ionomicina por 5-7 minutos, luego se lavaron en H-SOF + 10% FCS y se incubaron de 3 a 4 horas en un incubador a 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>; luego se lavaron los embriones con 2 ml de H-SOF + 10% FCS y se transfirieron al medio de cultivo (IVC).

#### Cultivo de los embriones reconstruidos

Los embriones reconstruidos se cultivaron en medio SOFaa desde la compleción de la activación hasta el estadio de blástula. Se hizo cambio de medio SOF aa con medio fresco el día 4 de cultivo y el día 6 usándose las mismas condiciones de cultivo que para embriones resultantes de IVF.

Transferencia de los embriones generados por clonación.

Los embriones se cultivaron hasta el estadio de blástula (día 7) y fueron transferidos a vacas receptoras que presentaron celo el día en que se efectuó la fusión y que mostraron uno o más cuerpos lúteos funcionales.

Los embriones fueron seleccionados de las placas de cultivo, se lavaron 5 veces en medio de mantenimiento (Fosfato buffer salino modificado de Dulbecco con suplementación de glucosa y ácido prúvico y antibióticos + 10% FCS) y se cargaron en el mismo medio de mantenimiento en pajuelas de 0.25cc para ser conducidas al establo y efectuar la transferencia por el método no quirúrgico intrauterino transcervical.

Preñez y parición

Las receptoras fueron supervisadas permanentemente durante toda la gestación hasta el nacimiento de las crías, efectuando observaciones por ultrasonografía para determinar la normalidad del proceso de gestación. Se indujo el aborto de las gestaciones anormales, presentándose fetos con mayor desarrollo que lo normal. Los nacimientos fueron programados mediante inducción por inyección de dexametasona (20 mg) 17 horas antes del parto programado.

Los partos supervisados fueron por vía cesárea, los terneros nacidos fueron atendidos post parto de acuerdo a la rutina de atención de terneros del establo.

## Análisis de los datos

Se registró la información de las siguientes variables:

- Número de embriones reconstruidos (reconstructos) resultado de enucleación de ovocito y fusión de célula de granulosa
- Número y porcentaje de reconstructos que degeneraron después de la fusión (antes de la activación)
- Número y porcentaje de reconstructos sometidos a activación
- Número y porcentaje de reconstructos que clivaron (mostraron divisiones celulares de desarrollo embrionario)
- Número y porcentaje de embriones logrados en el cultivo in vitro en los diversos estadios (2 células, 4 células, mórulas, blástulas al día 7, 8 y 9 de cultivo)
- Número y porcentaje de gestaciones, abortos y nacimientos

Los datos fueron tabulados de acuerdo a:

Vaca donante:

- vaca N° 7441;
- vaca N° 6561 y
- vaca N° 2043)

Tratamiento al que se sometió a las células de la granulosa de las vacas donantes:

- maduración como parte del COC por 24 horas; (nominadas como "maduradas")
- cultivadas como células somáticas por 3 días; (nominadas como "cultivadas")
- obtenidas directamente de los filtros de colección, sin maduración ni cultivo (nominadas como "colectadas")

Presencia o ausencia de cicloheximida en la activación del reconstructo:

- Activadas con ionomicina y enjuague en 6 DMAP 2 mM en SOF
- Activadas con ionomicina y enjuagadas en 6 DMAP 1 mM en SOF + 0.5 µl de cicloheximida 10 µg/µl en etanol

La comparación de los datos se hizo por Chi Cuadrado prueba de homogeneidad (Dowdy y Wearden, 1983).

## RESULTADOS

Se obtuvieron 324 reconstructos utilizando ovocitos enucleados que habían sido previamente madurados por 20 horas post colección por OPU y fusión para transferencia nuclear de células de la granulosa mural ovárica de tres vacas donantes; 158 reconstructos se obtuvieron con células de la granulosa maduradas, 45 con células cultivadas y 121 con células colectadas.

Los reconstructos mostraron una alta respuesta a la activación (91.35%) sin que hubiera diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos a los que se sometieron a las células de la granulosa ovárica (tabla 1).

**Tabla 1:** Número de reconstructos formados por transferencia nuclear utilizando ovocitos enucleados y células de la granulosa mural ovárica sometidas a diferentes tratamientos y su porcentaje de activación.

Tratamiento a la célula de la granulosa	Reconstructos obtenidos por transferencia nuclear y fusión	Activados (porcentaje sobre reconstructos o fusionados)
Maduradas (T1)	158	141 (89.24%) (a)
Cultivadas (T2)	45	40 (88.89%) (a)
Colectadas (T3)	121	115 (95.04%) (a)

(a) no hay diferencias entre tratamientos en a la prueba de homogeneidad Chi cuadrado en el porcentaje de reconstructos activados;  $P > 0.05$ .

Los resultados de la activación indicarían que siendo que los reconstructos fueron activados después de la fusión no se necesitaría que las células de la granulosa estuvieran en quiescencia (no necesitarían haber sido cultivadas e inducidas a quiescencia por restricción de suero) para obtenerse una activación satisfactoria lo que coincidiría con la observación de Wells et al., 1998; sin embargo, al compararse el clivaje (tabla 2) entre los tipos de tratamiento a la célula de la granulosa mural ovárica se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre tratamientos, siendo el porcentaje de clivaje en relación al número de reconstructos hechos con células de la granulosa ovárica cultivadas por 3 días antes de ser usadas en la transferencia nuclear, seguido por las células maduradas antes de ser usadas en la transferencia nuclear (61.7% de clivaje); el más bajo clivaje (41.7%) fue expresado por los reconstructos que se hicieron usando células de la granulosa ovárica simplemente colectadas (sin maduración ni cultivo) lo que influyó en el porcentaje total de clivaje que fue de 55.0%.

En la tabla 2 también se aprecia el número y porcentaje de reconstructos activados que resultaron en embriones transferibles (blástulas) de acuerdo a los tratamientos a los que se sometieron a las células de la granulosa utilizadas para la transferencia nuclear.

**Tabla 2:** Número y porcentaje de reconstructos que clivaron y que desarrollaron como embriones transferibles

Tratamiento a la célula de la granulosa	Reconstructos activados que clivaron	Reconstructos activados que resultaron en blastocistos
Maduradas	87 (61.7%) (b)	19 (13.5%) (b)
Cultivadas	28 (70.0%) (a)	12 (30.0%) (a)
Colectadas	48 (41.7%) (c)	1 (0.86%) (c)

Valores dentro de cada columna con diferente letra en paréntesis son diferentes ( $P \leq 0.01$ ) a la prueba de homogeneidad Chi cuadrado.

El mayor porcentaje de producción embrionaria en relación a los reconstructos activados fue mostrado por los reconstructos que utilizaron células de la granulosa cultivadas (30.0%), seguido por los que utilizaron células de la granulosa maduras (13.5%) siendo el más bajo porcentaje (0.86%) el obtenido con reconstructos que usaron células de la granulosa simplemente colectadas (sin maduración o cultivo), las diferencias entre tratamientos fueron altamente significativas ( $P < 0.01$ ) a la prueba de homogeneidad de Chi cuadrado.

Los porcentajes de preñez, abortos y nacimientos de los 32 embriones transferidos a recipientes se muestran en la tabla 3, donde se puede apreciar que la sobrevivencia hasta el nacimiento de los embriones producidos fue de 100% del único embrión producido con células de la granulosa simplemente colectadas (sin maduración o cultivo), siendo 8.33% para los embriones producidos con células de la granulosa maduras, sin haberse logrado cría nacida alguna para los embriones producidos usando células de la granulosa maduras.

**Tabla 3:** Evolución de gestaciones de clones bovinos obtenidos mediante transferencia nuclear de células de la granulosa mural ovárica.

Tratamiento a la célula de la granulosa	Blástocistos transferidas (n)	Gestaciones a 60 días	Gestaciones perdidas a 100 días	Terneritas nacidas vivas
Maduradas	19	3 (15.79%)	3(100.00%)	0(0.0%)
Cultivadas	12	4 (33.33%)	2(50.00%)	1 (8.33%)
Colectadas	1	1 (100.00%)	0 (0.00%)	1(100.00%)

**Tabla 4:** Eficiencia comparativa a lo largo de todo el proceso de clonación por transferencia nuclear de acuerdo al tipo de tratamiento efectuado a las células de la granulosa ovárica.

	Tipo de Células de la granulosa	Maduradas		Colectadas
			Cultivadas	
Fusiones	Nº	158	45	121
Activados	Nº (%)	141 (89.24)	40 (88.89)	115(95.04)
Clivados día 2 de cultivo	Nº (%)	87 (55.06)	28 (62.22)	48 (39.67)
Desarrollo al día 4 de cultivo	2 células	27	3	10
	4 células	13	12	18
	Más de 4 células	23	10	18
Mórulas	Nº (% sobre activados)	24 (17.02)	6 (15.00)	2 (1.73)
Blastocistos	Día 7	12	8	0
	Día 8	6	4	0
	Día 9	1	0	1
	Total	19	12	1
	% sobre activados	13.47	30.00	0.86
Gestaciones	Nº	3	4	1
	% sobre transferidos	15.79	33.33	100
Muertes antes de 100 días		3	2	0
Abortos provocados		0	1	0
Nacimientos		0	1	1

Las tendencias de sobrevivencia embrionaria se mostraron en el mismo orden desde los 60 días de gestación; no se registraron pérdidas a lo largo de toda la gestación en el grupo de embriones generados con células de granulosa colectadas (sin cultivo o maduración), en cambio el 100% de las gestaciones generadas con embriones construidos con células de la granulosa maduras y el 50% de las gestaciones generadas con embriones construidos con células

de la granulosa cultivadas se perdieron para el día 100 de gestación. En total el 25% de los embriones obtenidos por transferencia nuclear estaba vivo y gestándose a los 60 días de gestación, a los 100 días se habían perdido el 62.5 de las gestaciones llegando a nacer sólo el 6.25% de los embriones reconstruidos transferidos (perdiéndose el 93.75% de las gestaciones). De las pérdidas de gestación todas excepto una fueron abortos naturalmente ocurridos y una fue un aborto

inducido a los 180 días de gestación en el grupo de gestaciones de embriones generados con células de la granulosa cultivadas, debido a que el feto presentaba hidroalantoides. El nacimiento de las terneras fue por cesárea, la ternera L12888 clon de la vaca 7441 nació sin ninguna anomalía, tuvo un período perinatal absolutamente normal así como hubiese expresando un crecimiento normal de acuerdo a los promedios del establo y gozando de buena salud; la ternera L12890 clon de la vaca 6561 presentó una teratología cardíaca consistente en una apertura de la aurícula derecha y la arteria aorta produciéndose su muerte a tres días de nacida.

La tabla 4, muestra el cuadro resumen de eficiencia del proceso de acuerdo al tipo de tratamiento a que se sometió a las células de la granulosa ovárica antes de ser usadas como fuente de célula somática para la transferencia nuclear.

Las tablas 5, 6 y 7 muestran las eficiencias en la clonación de acuerdo a la vaca donante de las células de la granulosa ovárica, los tratamientos efectuados a las células de la granulosa y la sustancia empleada para la activación química de los reconstruccionados.

**Tabla 5:** Eficiencia de clonación de la vaca 7441.

Treatment to the cell of the granulosa	Maduradas (T1)	Cultivadas (T2)
Number of reconstructed embryos generated	106	23
Substance used for activation in the culture	6 DMAP 1 mM in SOF + 0.5 µl of cycloheximide 10 µg/µl in ethanol	6 DMAP 2 mM in SOF
Activated reconstructed embryos (% of fused)	89 (80.77%)	20 (87.00%)
Cloned embryos (% of activated)	45 (50.56%)	13 (65.50%)
Implanted embryos and transferred (% of activated)	14 (15.70%)	8 (40.00%)
Pregnancies (% of transferred embryos)	3 (21.42%)	4 (50.00%)
Abortions (% of pregnancies)	3 (100.00%)	3 (75.00%)
Births (% of transferred embryos)	0 (0.00%)	1 (12.5%)
		Arete N° 12888

Se logró un clon de la vaca 7441, la ternera N° 12888; la prueba de ADN se efectuó en base a muestra de folículo piloso y a suero sanguíneo tanto de la vaca como de la ternera; las muestras fueron colectadas oficialmente por personal de Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria) del Perú; los resultados del análisis muestran que el ejemplar 7441 presenta compatibilidad con el perfil genético del ejemplar 12888 en 18 marcadores genéticos analizados (SSR: BM 1824, BM 2113, ETH10, ETH 225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA 126, TGLA 227, TGLA 53, BM1258, BM1314, BM1818,

CSSM66, HAUT27, ILSTS006 Y MM12), confirmándose por lo tanto que la ternera N° 12888 es clon de la vaca 7441. La fotografía 2, muestra la vaca 7441 y su clon la ternera 12888 al mes de nacida.



**Figura 2:** La vaca 7441 y su clon la ternera 12888 al mes de nacida, en el establo de LACTEA SA, Virú, Trujillo, Perú.

La ternera 12888 clon de la vaca 7441 fue resultado del embrión reconstruido generado con células de la granulosa ovárica de la vaca 7441 que fueron sometidas a cultivo por tres días antes de su uso en la transferencia nuclear y que fueron activados con ionomicina y enjuague con sólo 6 DMAP 2 mM en SOF sin cicloheximida. Las tasas de fusión, activación, producción embrionaria y gestación fueron altas y muy satisfactorias pero el 75% de las gestaciones fueron perdidas lo que determinó al final una eficiencia de sólo 12.5% de crías nacidas de embriones transferidos (5% de crías nacidas en relación a los reconstruccionados activados de células de granulosa cultivadas). Los reconstruccionados de células de granulosa maduradas de la vaca 7441 tuvieron baja eficiencia a lo largo del proceso y no produjeron cría.

La eficiencia de la clonación de la vaca 6561 se muestra en la tabla 6, las células de granulosa ovárica de la vaca 6561 fueron sometidas ya sea a cultivo por tres días o fueron colectadas del COC (sin maduración, sin cultivo) y todos los reconstruccionados fueron activados con ionomicina y enjuague sólo con 6 DMAP 2 mM en SOF. El porcentaje de activación de los reconstruccionados originados con células de la granulosa colectadas fue alto no así el clivaje ni la tasa de generación de embriones (0.9% de blástulas) pero la sobrevivencia hasta el nacimiento de la blástula transferida fue 100% obteniéndose la ternera 12890 clon de la vaca 6561. Esta ternera 12890 mostró un defecto congénito (teratología cardíaca) y murió a los 3 días de nacida. También se tomaron muestras de la vaca 6561 y su clon 12890 y se analizaron en el laboratorio del INIA; los análisis mostraron que el ejemplar 6561 presenta compatibilidad con el perfil genético del ejemplar 12890 en 18 marcadores genéticos analizados que fueron los mismos marcadores ya mencionados en el caso de la vaca 7441. Las células de la granulosa cultivadas de la vaca 6561 no produjeron gestación ni cría nacida.

**Tabla 6:** Eficiencia de clonación de la vaca 6561.

Tratamiento a la célula de la granulosa	Colectadas (T3)	Cultivadas (T2)
Número de reestructos generados	121	22
Sustancia usada para enjuague en la activación	6 DMAP 2 mM en SOF	6 DMAP 2 mM en SOF
Reestructos activados (% sobre fusionados)	109 (95.00%)	18 (90.00%)
Clivados (% sobre activados)	48 (41.74%)	15 (75.00%)
Blástulas logradas y transferidas (% sobre activados)	1 (0.9%)	4 (20.00%)
Gestaciones (% sobre blástulas transferidas)	1 (100.00%)	0 (0.00%)
Abortos (% sobre gestaciones)	0 (0.00%)	-
Nacimientos (% sobre blástulas transferidas)	1 (100.00%) Arete N° 12890	0 (0.00%)

La eficiencia de clonación de la vaca 2043 se muestra en la tabla 7. Las células de granulosa ovárica de la vaca 2043 usadas para la reconstrucción embrionaria fueron todas células maduras por 20 horas como parte del COC. La activación se hizo con ionomicina seguida de enjuague con 6 DMAP 1 mM en SOF + 0.5 µl de cicloheximida 10 µg/µl en etanol. El porcentaje de activación y de clivaje fue alto no así la generación de blástulas y éstas no sobrevivieron después de su transferencia a receptoras.

**Tabla 7:** Eficiencia de clonación de la vaca 2043.

Tratamiento a la célula de la granulosa	Maduradas (T1)
Número de reestructos generados	52
Sustancia usada en la activación	6 DMAP 1 mM en SOF + 0.5 µl de cicloheximida 10 µg/µl en etanol
Reestructos activados (% sobre fusionados)	52 (100.00%)
Clivados (% sobre activados)	42 (80.70%)
Blástulas logradas y transferidas (% sobre activados)	5 (9.60%)
Gestaciones (% sobre blástulas transferidas)	0 (0.00%)
Abortos (% sobre gestaciones)	-
Nacimientos (% sobre blástulas transferidas)	0 (0.00%)

## DISCUSIONES

Los resultados de nuestro trabajo confirman trabajos anteriores (Wells et al., 1998, 1998a, 1999) que demuestran que las células de la granulosa mural ovárica obtenidas de vacas adultas vivas pueden ser reprogramadas exitosamente luego de ser transferidas por el proceso de transferencia nuclear a ovocitos maduros enucleados y producir terneras vivas y normales. El estudio también demuestra que no es necesario que las células de la granulosa tengan que estar en quiescencia para poder ser usadas como núcleo en el proceso de clonación por transferencia nuclear ya que hemos obtenido una cría usando células de la granulosa que simplemente fueron cosechadas de los COC inmediatamente después de la colección así como de células cultivadas pero que no fueron deprivadas de suero para inducir quiescencia; Wakayama et al., 1998 y Schuetz et al., 1996 mencionan que hay células cosechadas del animal que pueden estar naturalmente arrestadas en quiescencia sin que se les tenga que inducir, lo que parece explicar las respuestas que hemos tenido en la generación de embriones y crías con células de granulosa sin inducción artificial de quiescencia. Nuestros resultados muestran también una falta de diferencia en la eficiencia de activación entre los diferentes tipos de células de la granulosa mural ovárica usadas en la transferencia nuclear (maduradas, cultivadas o colectadas) y podría deberse a que se realizó la fusión antes de la activación y por lo tanto la célula somática tuvo un tiempo relativamente prolongado en contacto con el citoplasma lo cual tiene un efecto positivo en la reprogramación tal como lo demostraron Wells et al. (1998).

En todos los grupos la activación fue relativamente alta ya sea que el proceso de activación se haya inducido seguido de lavaje sólo con DMAP o con DMAP + cicloheximida lo que indicaría que se podría prescindir de la cicloheximida.

El clivaje y la producción de embriones transferibles fue baja en el grupo de reestructos generados con células de la granulosa colectadas (sin maduración o cultivo), no así en los reestructos generados con células de la granulosa maduras o cultivadas que mostraron porcentajes relativamente adecuados de clivaje y producción embrionaria, en cambio el porcentaje de preñez y de sobrevivencia hasta el nacimiento fue alto en el grupo de reestructos generados con células de granulosa colectadas (sin maduración o cultivo) que en los generados con células de granulosa maduras o cultivadas. Hasta ahora, en los trabajos de clonación se sigue teniendo porcentajes relativamente elevados de muerte embrionaria y de pérdida fetal y podrían estar relacionados con los efectos combinados de deficiencias en la manipulación durante la transferencia nuclear o fallas en el proceso de reprogramación o del sistema in vitro usado para el cultivo o las mismas receptoras que gestan los embriones reconstruidos, es necesaria más investigación para identificar las causas y optimizar los resultados, Miyoshi et al., 2003, indican que incrementando la uniformidad de los ovocitos receptores y de las células somáticas en la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear debe resultar en incrementos de eficiencia en la clonación de individuos.

## CONCLUSION

El hecho de que se pueda clonar mediante transferencia nuclear un embrión o un individuo adulto aún a las eficiencias actuales es un gran avance en la mejora genética animal con una aplicabilidad muy extensa.

## CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: IL, RD, FC Desarrollo de la metodología: CG, WV. Concepción y diseño: WV, DP. Edición del artículo: DP. Supervisión del estudio: WV, IM.

## AGRADECIMIENTOS

El estudio ha sido financiado por el Programa Nacional de Innovación Agraria del Perú y las compañías LACTEA SA y VIVANCO INTERNATIONAL SAC.

## REFERENCIAS

- Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod*. 1993; 49:933-942.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from quiescent fetal fibroblasts. *Science*. 1998; 280:1256-1258.
- Dowdy S, Wearden S. *Statistics for Research*. John Wiley and Sons Inc. 1983; ISBN 0-471-08602-9.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*. 2007; 67: 90-98. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.011
- Miyoshi K, Ruzicidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 1079-1086. doi: 0.1095/biolreprod.102.010876
- Schuetz AW, Whittingham DG, Snowden R. Alterations in the cell cycle of mouse cumulus granulosa cells during expansion and mucification in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8:935-943.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod*. 1996; 54:100-110.
- Vivanco HW, Olifent M, Forsyth J, Berg M, Saywell M, Li N, Tervit R. Production of Live Normal Calves From Embryo Reconstructs Generated by Nuclear Transfer of Blastomeres from In Vitro Produced Embryos. 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstracts Vol 2, 19:15.
- Vivanco HW, Graeney KB. Comparison of survival of bisected and whole sheep embryos transferred in-season and out of season. *Theriogenology*. 1992; 37 (1): 316.
- Vivanco HW, Rangel R, Lynch P, Rhodes A. Large scale commercial application of bisection of sheep embryos. *Theriogenology*. 1991; 35 (1): 292.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson LR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998; 394:369-374.
- Wells DN, Misica PM, Day AM, Tervit HR. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo and in vitro matured cytoplasts. *Biol Reprod*. 1997; 57:385-393.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reproduction Fertility and Development*. 1998. Vol 10, pages 369-378.
- Wells, DN, Misica PM, Forsyth, JT, Berg MC, Lange JM, Tervit HR, Vivanco HW. The use of Adult Somatic Cell Nuclear Transfer to Preserve the Last Surviving Cow of the Enderby Island Cattle Breed. *Theriogenology*. 1999; 51 (1): 21
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*. 1999a; 60: 996-1005. doi: 10.1095/biolreprod60.4.996
- Wilmut I, Schneike AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-813. doi:10.1038/385810a0