

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



Generación de embriones bovinos por transferencia nuclear somática:
Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vivo* e *in vitro* y de la
expresión génica en las etapas pre y peri-implantatorias

Presentado por
Lleretny Rodríguez Alvarez

Chillán-Chile

2009

RESUMEN

La clonación somática es una poderosa herramienta para la producción de animales con un genotipo específico, ya sea para fines productivos a través de la multiplicación de ejemplares de alto valor genético, la creación de animales transgénicos o para la conservación de especies en peligro de extinción. En la última década esta tecnología se ha ido perfeccionando y hoy en día se ha logrado la obtención de clones en dieciséis especies de mamíferos. La aplicación de la transferencia nuclear es limitada debido a la ineficiencia del proceso en término de animales nacidos y al desconocimiento de la expresión génica que gobierna el proceso de clonación, por lo que es sujeto de estudio a nivel mundial.

En este trabajo se empleó una metodología novedosa de transferencia nuclear somática, conocida como Hand Made Cloning (HMC) para generar embriones bovinos clonados, usando dos líneas celulares distintas como donantes de núcleo, una de fibroblastos de piel de un animal adulto y la otra de un feto. Se evaluó el potencial de desarrollo de los embriones generados con ambas líneas, en términos de desarrollo *in vitro* hasta blastocistos, así como morfología y calidad. Se demostró que con la línea celular adulta es posible generar con mayor eficiencia y calidad embriones clonados en bovinos.

Para caracterizar la expresión génica en blastocistos (etapa peri-implantatoria) generados a partir de ambas líneas se empleó PCR tiempo final y real y se comparó ésta con los patrones de expresión de embriones producidos mediante fecundación *in vitro* (FIV). Se estudiaron los patrones de expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario, concluyendo que los mismos son diferentes entre las líneas celulares y entre éstas y los embriones de FIV. Los patrones de expresión génica de los embriones producidos con la línea celular adulta fueron más parecidos a los de los controles, por ello y por el mayor potencial de desarrollo hasta blastocistos de calidad, se seleccionó esta línea para la producción de embriones elongados (día 17) y de clones a términos.

Se transfirieron a hembras receptoras embriones clonados producidos a partir de la línea celular adulta, así como controles producidos por FIV y se recolectaron al día 17. A partir de estos embriones, se estudiaron los patrones de expresión génica por técnicas de PCR tanto a tiempo real como final de los embriones elongados (etapa peri-implantatoria) clonados y de FIV, siendo diferencial la expresión entre ambos y ésta a su vez diferente con respecto a los blastocistos de

día 7, tanto para FIV como para los clones. Estos hallazgos, así como la cuantificación de los niveles de expresión de algunos genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano, constituyen los primeros reportes de su tipo en la literatura del tema.

Adicionalmente se estudió a nivel global, la expresión génica en embriones clonados a partir de células adultas y producidos por FIV, mediante microarreglos, se encontraron más de mil genes expresados en ambos grupos y de éstos alrededor del 4% se encontró diferencialmente expresado (hiper o hipo expresión) en los embriones clonados. Los datos del microarreglo fueron validados por PCR cuantitativo (PCR tiempo real), lo cual a su vez ofreció resultados novedosos en el tema, al reportarse por primera vez los niveles de expresión de ciertos genes en embriones bovinos elongados.

Como elemento final, se transfirieron embriones clonados a hembras receptoras, lográndose gestación en la mitad de las hembras transferidas, lo que redundó en el nacimiento de dos terneras clonadas. La eficiencia del proceso fue similar a la descrita para la técnica de HMC y para la especie bovina. A pesar de las pérdidas gestacionales observadas, que también coinciden con lo reportado para la especie, se logró por primera vez en Chile el nacimiento de terneros clonados viables.

