PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES PORCINOS TRANSGÉNICOS

[1]F García-Vázquez, [1]E García-Roselló, [1]D Gumbao, [2]A Gutiérrez-Adán y [1]J Gadea

[1]Dept. Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.
[2]Dept. Reproducción Animal, INIA, Madrid. E-mail: fagarcia@um.es.
http:///www.um.es/grupo-fisiovet

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones transgénicos tiene un gran interés debido a sus posibles aplicaciones en biomedicina (modelos experimentales, modelos de enfermedades humanas) y agricultura (mejor y mayor producción, resistencia a enfermedades, etc.) como recientemente ha sido revisado por Wheeler et al (2003). Una especial importancia puede tener la producción de cerdos transgénicos destinados a la posible donación de órganos para humanos (xenotransplantes).

Hasta el momento, la microinyección pronuclear ha sido la técnica más utilizada para la generación de animales transgénicos (Gordon *et al*., 1981). Esta metodología es eficiente en ratón pero no así en otras especies donde presenta unos bajos rendimientos junto con unos costes muy elevados. Por tanto, se han desarrollado otros métodos alternativos como vectores retrovirales, células madre embrionarias, biolistica, células germinales primordiales, etc. Sin embargo, su eficiencia hasta el momento es baja. Una posible alternativa viable a dichas técnicas es la de aprovechar la capacidad que tienen los espermatozoides de captar y transferir ADN exógeno (Brackett *et al*., 1971). Esta técnica denominada "Transgénesis mediada por espermatozoides" (SMGT) presenta varias ventajas como son la "relativa" sencillez de la técnica, bajo coste y mayor eficiencia (Lavitrano *et al*., 1989; Perry *et al*., 1999; Shim *et al*., 2000).

El objetivo de este trabajo es revisar y mostrar de forma conjunta las experiencias desarrolladas por nuestro equipo en este campo. En primer lugar se evaluó el efecto del plasma seminal sobre la unión del ADN al espermatozoide, en segundo lugar se estudio la cinética de unión del espermatozoide al ADN exógeno mediante citometría de flujo, y finalmente la producción de embriones porcinos transgénicos mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

MATERIAL Y MÉTODOS

Experiencia 1: Evaluación de la unión espermatozoide–ADN y efecto del plasma seminal.

Se estudió el efecto de la presencia del plasma seminal (0, 10 y 50% de plasma seminal) sobre el porcentaje de espermatozoides que se unieron a un ADN exógeno después de un periodo de coincubación de 2 y 24h. Para ello se utilizó un ADN marcado con rodamina (pGeneGrip-Rhodamine/ GFP Gene Therapy System) que permite detectar la unión espermatozoide-ADN mediante la observación con microscopio de fluorescencia. El semen procedente de 6 machos de fertilidad probada fue procesado de acuerdo al protocolo de Lavitrano *et al*. (2003) en medio

SFM y unas condiciones de incubación de $6x10^6$ espermatozoides y 250 ng de ADN a temperatura ambiente.

Experiencia 2: Uso de citometría de flujo para evaluar la cinética de unión espermatozoide-ADN.

La finalidad de este estudio fue evaluar la capacidad de unión de los espermatozoides al ADN (previamente marcado con fluoresceína) a lo largo del tiempo, usando el citómetro de flujo. Semen de 5 verracos de fertilidad probada fue procesado en medio SFM. $1x10^8$ espermatozoides/ml fueron coincubados con un plásmido lineal (5μg ADN/ml), marcado con fluoresceína-12-dUTP (random primer DNA labeling, Roche, Germany) e incubado a 16ºC. La tasa de unión del ADN fue evaluada mediante citometría de flujo a los 0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos de incubación.

Experiencia 3: Producción de embriones porcinos transgénicos mediante el uso de la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI).

En esta última experiencia se evaluó la eficiencia de la técnica para la producción de embriones transgénicos mediante ICSI. Para ello se utilizaron espermatozoides, libres de plasma seminal, como vectores para transferir ADN exógeno (que expresa la proteína GFP: Green Fluorescent Protein; plasmido pEGFP-N1, Clontech Laboratorios, Inc., Palo Alto, CA, USA) en ovocitos madurados in vitro. Los ovocitos fueron madurados en medio NCSU-37 durante 44h a 38.5ºC, 5% CO_2 en aire (Funahashi y Day, 1993). El procesado del semen se realizó del mismo modo que en la *experiencia 2*. La incubación ADN-espermatozoides se realizó durante 30 min a 16ºC; 5 min antes de la ICSI fueron precalentados a 37ºC. Los ovocitos denudados fueron lavados 2 veces en medio DPBS suplementado con 10% de suero fetal de ternera. Una vez inyectados los ovocitos fueron lavados y cultivados en medio TALP durante 18h. Finalmente el desarrollo embrionario se realizó en medio NCSU-23. Los embriones fueron evaluados a las 48h tras la inyección para conocer la tasa de división (cleavage), y a las 144h para el desarrollo embrionario (blastocistos). La expresión de la proteína verde fluorescente en los embriones fue evaluada mediante observación bajo microscopio de fluorescencia invertido. Posteriormente los embriones fueron fijados en etanol absoluto 24h y teñidos con Hoescht 33342 para evaluar así el número de células en el embrión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de plasma seminal en el proceso de coincubación inhibió la unión del ADN al espermatozoide. Los espermatozoides con menor porcentaje de plasma (0 y 10%) se unieron en mayor medida al ADN (18.10±2.80% y 14.59±3.63, respectivamente), que aquellos en los que el plasma seminal estaba presente en un 50% (5.65±0.80; $p=0.008$). Se detectó un marcado efecto del macho sobre las tasas de unión ($p<0.001$). Estos resultados preliminares confirman un efecto inhibidor de los componentes del plasma seminal sobre la unión entre ADN-espermatozoide (Zani *et al.* 1995), por lo que para las experiencias siguientes, dicho plasma seminal fue eliminado tras la recolección del semen.

Cuando se utilizó la citometría de flujo para evaluar el grado de unión a lo largo del tiempo de coincubación se observó que la mayor parte del ADN se incorpora al espermatozoide en los primeros 15 min de incubación (15.69±0.93) incrementándose significativamente hasta los 30 min (17.89±0.63) para continuar con un incremento no significativo a los 60 min (17.69), 90 min (18.02) y 120 min (19.49). Igualmente se detectó un marcado efecto del macho sobre las tasas de unión ($p<0.001$). La tasa de unión detectada por citometría fue más baja que la obtenida por microscopía probablemente debido a que solo son contabilizadas las células con una fuerte unión al ADN exógeno. Por lo tanto los resultados sugieren que el citómetro de flujo es una valiosa herramienta para evaluar la capacidad de unión específica, además de ser un método objetivo, exacto y fácilmente reproducible si lo comparamos con el método tradicional de microscopía.

La utilización de la ICSI con espermatozoides incubados con ADN permitió obtener una tasa de división embrionaria del 44% (64/144 ovocitos), 16 de los cuales (25%) se encontraban en estadio de blastocisto con un número medio de células de 22.7. Un total de 14 (21.8%) embriones expresaron la proteína verde fluorescente (GFP) en estadios variables desde 2 células hasta estadio de blastocisto.

Estos resultados preeliminares demuestran que la "Transgénesis mediada por espermatozoides" (SMGT) podría ser una herramienta adecuada para la obtención de cerdos transgénicos, siendo una alternativa a los métodos clásicos utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowiski H (1971). Uptake of heterologus genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. Proc Natl Acad Sci USA 68:353-357.
- Funahashi H, Day BN. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. J Reprod Fert, 1993; 99:97-103.
- Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science. 1981 Dec 11; 214 (4526): 1244-6.
- Lavitrano M, Camanioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreing DNA into eggs: genetic transformation of mice. Cell 1989 Jun 2; 57(5): 717-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. Mol Reprod Dev. 2003 Mar;64 (3):284-91.
-Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracitoplasmic sperm injection. Science. 1999 May 14; 284 (5417): 1180-3.
- Shim SW et al. (2000). Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology vol.1, p. 521.
- Wheeler MB, Walters EM, Clark SG. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. Anim Reprod Sci. 2003 Dec 15;79(3-4):265-89.
- Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S, Spadafora C. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. Exp Cell Res. 1995 Mar;217(1):57-64.