EFECTO DEL TRATAMIENTO ESPERMÁTICO Y EL TAMAÑO DE ADN EN LA INTERACCIÓN TRANSGÉN- ESPERMATOZOIDE EN LA ESPECIE PORCINA

García-Vázquez, F., Gumbao, D., [1]Gutiérrez-Adán, A., Gadea, J.

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

INTRODUCCIÓN

La transgénesis ha sido uno de los más recientes e importantes avances en la biotecnología animal, existiendo aplicaciones en áreas diversas tales como la investigación biológica, biomédica, genética (genes implicados en el cáncer, regulación del sistema inmunológico, control del crecimiento), agropecuaria (mejora de la producción, resistencia a enfermedades), modelos animales como donadores de órganos, etc.

Hasta el momento, la microinyección pronuclear del material genético ha sido la técnica más utilizada para la generación de animales transgénicos (Gordon y Ruddle, 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, biolística, 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).

El objetivo de este trabajo es evaluar mediante el uso del citómetro de flujo, cual es el tratamiento espermático que nos proporciona un mayor % de unión entre el transgén y las células espermáticas, además de conocer qué tamaño de ADN exógeno es capaz de transportar el espermatozoide.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experiencia 1. Efecto del tratamiento espermático en la interacción ADN exógeno- espermatozoide

El objetivo de esta experiencia fue comparar el grado de unión que existe entre espermatozoides intactos (sin las membranas alteradas) y espermatozoides a los que intencionadamente se les han permeabilizado las membranas en mayor o menor grado, ya sea de forma física (congelación-descongelación rápida) o de manera química (Tritón X100, DMSO 0.3 % y 3%). En cada una de las experiencias se ajustó la concentración de la suspensión espermática a 10^8 células espermáticas/ml a los que se le añade 5 µg del ADN exógeno/ml. Los tratamientos espermáticos utilizados fueron los siguientes:

1) Semen intacto: El semen fue preparado por el método descrito por Lavitrano *et al.* (2003). Tras la recogida de la fracción rica del eyaculado y la dilución del semen 1:1 en medio SFM sin BSA, fue trasladado al laboratorio a 37 ºC. Una vez en el laboratorio, se diluyó de nuevo en medio SFM (37 ºC) en una proporción de 1:10, y se centrifugó a 800g durante 10 min a 25 ºC. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en SFM (con BSA) a 25 ºC, de nuevo se centrifugó a 800g 10 min a 25 ºC; descartamos el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml del medio con BSA a 25 ºC.

2) Permeabilización de membranas con el detergente Triton X100: La solución de tritón fue prepara de acuerdo con el protocolo descrito por Perry *et al*. (1999). Para ello, 100 µl de Triton X100 al 0.5% fue añadida a 900 µl de la suspensión espermática. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, la muestra fue centrifugada dos veces (3 min a 10.000g). El pellet fue recuperado y resuspendido en medio SFM con BSA.

3) Ruptura de las membranas por congelación/descongelación rápida: Se introdujo una suspensión de espermatozoides intactos en un baño de nitrógeno líquido durante 20 seg, seguido de la inmediata descongelación por inmersión en un baño de agua atemperada a 37 ºC. Este proceso se repitió 3 veces. Tras el proceso se confirmó que todas las células espermáticas tenían alteraciones graves de la estructura de su membrana mediante la observación microscópica de las muestras teñidas con ioduro de propidio.

4) Tratamiento con dimetilsulfóxido (DMSO): Se siguió el protocolo descrito previamente por Shen *et al.* (2006) y Li *et al.* (2006) en las especies murina y cunícola. Los espermatozoides intactos se suplementaron con DMSO (diluido en medio SFM) hasta alcanzar una concentración final de 0.3 y 3%, según experiencias. A esta suspensión se le añadió el transgén, siendo esta mezcla conservada a 4 ºC durante 10-15 min.

Experiencia 2. Efecto del tamaño del transgén sobre la unión con el espermatozoide

Se usaron dos tamaños diferentes del transgén 5Kpb (EGFP) y 11Kpb (EGFP + 2 secuencias MAR), marcados con fluoresceína con el objetivo de conocer qué tamaño de ADN era capaz de transportar los espermatozoides. Del mismo modo que en la experiencia anterior se midió la unión a diferentes tiempos estableciendo la curva de incorporación al espermatozoide y el porcentaje de unión para los dos tipos de transgén.

Para realizar estos estudios (en ambas experiencias) de unión al ADN y simultáneamente la evaluación de la viabilidad celular fue necesario el empleo de dos fluorocromos. Los espermatozoides fueron incubados con el ADN marcado con fluoresceína más loduro de propidio (9.6 µl I.P. de la solución stock 500 µg/ml, por cada ml de muestra), y medidos en el citómetro. Al utilizar conjuntamente dos fluorocromos es posible distinguir 4 subpoblaciones que describimos a continuación: 1) Espermatozoides vivos sin ADN unido (Ningún signo de fluorescencia) 2) Espermatozoides vivos con el ADN unido (Únicamente fluorescencia verde) 3) Espermatozoides muertos con ADN unido (Fluorescencia verde y roja) 4) Espermatozoides muertos sin ADN unido (Fluorescencia roja).

Se analizaron, mediante el citómetro de flujo, 10000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones en cada tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90, 120 min), a una velocidad de 500 células/segundo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experiencia 1. Efecto del tratamiento espermático en la interacción ADN exógeno- espermatozoide

Los resultados muestran que tanto la viabilidad espermática como la capacidad de unión al ADN exógeno están afectadas por el tratamiento espermático, el macho utilizado y varía a lo largo del tiempo de incubación. El semen procesado por centrifugación para eliminar el plasma seminal presenta una menor viabilidad que el no lavado (65.10 *vs.* 72.89) pero por el contrario mejora el porcentaje de unión al ADN (35.76 *vs.* 29.18). El tratamiento con DMSO tanto al 0.3 como al 3% no mejora ni la viabilidad ni la capacidad de unión al ADN. Los tratamientos que alteran la estructura de la membrana (TritonX100 o procesos

repetidos de congelación descongelación) permiten que el grado de unión al ADN se aproxime a la totalidad, aunque lógicamente la viabilidad es prácticamente nula.

Tabla 1. Valores medios de los porcentajes de unión al ADN exógeno y viabilidad espermática para muestras sometidas a diversos tratamientos (incubación de 0 a 120 min).

Tratamiento	% Espermatozoides vivos	% Espermatozoides unidos	% vivos y unidos
No lavado	72.89±0.61a	29.18±0.63a	2.68±0.11
Intactos	65.10±0.97b	35.76±0.98b	1.40±0.06
DMSO 0,3%	67.56±0.87bc	32.97±0.94bc	1.62±0.06
DMSO 3%	68.66±0.98c	31.95±0.97ac	1.84±0.07
Triton x-100	6.96±0.98d	94.16±0.81d	5.17±0.90
Cong-desc	3.63±0.14e	98.53±0.10d	2.62±0.13

Experiencia 2. ***Efecto del tamaño del transgén sobre la unión con el espermatozoide***

Los resultados muestran que no existe un efecto significativo en los parámetros estudiados asociados al tamaño del transgén utilizado, y el mayor porcentaje de unión tiene lugar en los primeros 15 min de incubación en ambos grupos (Grupo 5Kbp: 13.43±0.74; Grupo 11Kbp: 13.97±0.77), en los siguientes períodos de incubación no es detectado ningún incremento significativo en la unión (Grupo 5Kbp: 14.27±0.88, 14.16±1.05, 13.41±1.11, 13.53±1.26; Grupo 11Kbp: 13.97±0.77 15.23±0.93 15.19±0.92 15.17±1.05; a 30, 60, 90 y 120 min, respectivamente). Además existe un marcado efecto dependiendo del macho utilizado. Por lo que podemos concluir que los espermatozoides de porcino pueden transportar con la misma eficiencia ADN exógeno de 5kbp y 11kbp.

Trabajo financiado por BICARM 10BIO2005/01-6463.

BIBLIOGRAFÍA

- Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowiski H. Proc Natl Acad Sci USA 1971, 68:353-357.
- Gordon JW, Ruddle FH. Science. 1981 Dec 11; 214 (4526): 1244-6.
- **Lavitrano M, Camanioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C**. Cell 1989 Jun 2; 57(5): 717-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Mol Reprod Dev. 2003 Mar; 64 (3):284-91.
- Li L, Shen W, Min L, Dong H, Sun Y, Pan Q. Reprod Fertil Dev. 2006; 18(6):689-95.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Science. 1999 May 14; 284 (5417): 1180-3.
- Shen W, Li L, Pan Q, Min L, Dong H, Deng J. Mol Reprod Dev. 2006 May; 73(5):589-94.