ESPERMATOZOIDES COMO VECTORES DE ADN EXÓGENO: PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PORCINOS TRANSGÉNICOS MEDIANTE DIFERENTES TRATAMIENTOS ESPERMÁTICOS

García-Vázquez, F., Grullón, L., Ruiz, S., [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

Bracket *et al.* (1971) fueron los primeros en demostrar que los espermatozoides de los mamíferos tienen la habilidad intrínseca de unirse a ADN exógeno. En 1989, Lavitrano *et al.* usando el ratón como modelo, publican que la capacidad de los espermatozoides de unirse a ADN podría ser usada para introducir ADN exógeno en los ovocitos durante la fecundación para conseguir producir animales transgénicos. Esta publicación generó un gran interés en la comunidad científica porque "la transferencia de ADN por los espermatozoides" era un proceso simple y de bajo coste. Sin embargo, las dificultades en la reproducibilidad y la baja eficiencia en la integración de los transgenes en el genoma del animal, provocó una considerable controversia durante numerosos años (Brinster *et al.,* 1989). No obstante, numerosos trabajos han sido publicados en los últimos años confirmando que los espermatozoides de numerosas especies, incluidas las de granja, y peces, pueden ser usados como vectores para llevar transgenes dentro del genoma del animal (Smith y Spadafora, 2005).

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el tratamiento espermático más adecuado para la producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos por ICSI, además de la producción de lechones obtenidos por inseminación intrauterina profunda con semen incubado con el transgén.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experiencia 1. Efecto de diferentes tratamientos espermáticos sobre el desarrollo de embriones transgénicos fecundados por ICSI

Esta experiencia se diseñó con el propósito de conocer el tratamiento espermático más adecuado para la obtención del mayor porcentaje de embriones transgénicos y calidad embrionaria en comparación con embriones fecundados con semen intacto. 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 añadió 5 µg del ADN exógeno/ml. Los tratamientos espermáticos llevados a cabo fueron los siguientes:

- 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. Posteriormente, 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 centrifuga a 800g 10 min a 25 ºC; se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de SFM con BSA a 25 ºC.

- Congelación de espermatozoides: Las pajuelas de semen porcino de 0.5 ml fueron descongeladas en un baño a 52 ºC durante 12 segundos, y resuspendidas en SFM (atemperado a 37 ºC, ratio 1:5). Se lavó la muestra dos veces mediante centrifugación 10 min (800g y 25 ºC) para eliminar el medio de congelación y los restos celulares. Finalmente, el pellet fue resuspendido en medio SFM.

- Rotura de las membranas por congelación/descongelación rápida: los espermatozoides intactos se sometieron a un proceso de congelación rápida sumergiendo

las muestras en nitrógeno líquido durante 20 seg, seguido de una inmediata descongelación por inmersión en un baño de agua atemperada a 37 ºC. Este proceso se repitió 3 veces. Posteriormente 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.

- Transcriptasa inversa RecA: Esta experiencia fue realizada para comprobar el efecto de la transcriptasa inversa, denominada RecA, sobre la mejora en la producción de embriones transgénicos en relación con las experiencias anteriores. RecA fue incubada con el transgén (GFP), y luego este complejo formado RecA:ADN se incubó con los espermatozoides. Estos se utilizaron para fecundar los ovocitos por ICSI. Los complejos RecA:ADN fueron preparados como describe Kaneko *et al.* 2005.

Ovocitos madurados *in vitro* fueron inyectados con espermatozoides sometidos a los diferentes tratamientos antes descritos mediante la técnica de ICSI descrita previamente por García-Roselló *et al.* (2006). Las primeras 20h post-inyección los supuestos cigotos se cultivaron en medio TALP, pasado este tiempo se traspasaron a medio de cultivo embrionario NCSU-23. A los 7 días posfecundación se evaluaron los siguientes parámetros::

- Porcentaje de división embrionaria (% División): se contabilizó el número de embriones en estadío de 2-4 células con respecto al total de los cigotos que iniciaron el cultivo embrionario.
- Porcentaje de blastocistos (% Blastocistos): se valoró como el número de blastocistos con respecto al total de embriones divididos.
- Porcentaje de embriones transgénicos (% Transgénicos): se evaluó como el número de embriones que expresaban la proteína verde fluorescente GFP

El total de ovocitos inyectados para el grupo de espermatozoides congelados fueron para el grupo control (intactos): 146, y para el grupo experimental: 143. Para el grupo congelación rápida: Control (Intactos): 105, y congelación rápida: 101. Para el grupo RecA se hicieron 9 replicados con un total de 244 ovocitos inyectados (Intactos: 115; RecA: 129).

Experiencia 2. Inseminación intrauterina profunda con semen incubado con ADN exógeno

Se inseminaron 4 cerdas mediante una sonda de inseminación intrauterina profunda (Fireflex®), con semen incubado con ADN exógeno. El semen fue preparado como se ha descrito en la experiencia anterior, utilizando semen intacto (fresco). Se preparó en una proporción $1000x10^6$ espermatozoides/ 250 µl ADN (EGFP 200ng/µl) en un volumen total de 10 ml SFM/BSA. La suspensión se dejó incubando a 16 ºC durante 2h, moviendo los tubos cada cierto tiempo para evitar la sedimentación. La muestra fue precalentada a 37 ºC 10 min antes de la inseminación. Se realizaron dos inseminaciones espaciadas 12h para cada cerda, con el semen del mismo eyaculado conservado a 16 ºC.

A los lechones obtenidos se les valoró tanto la posible expresión del transgén (visualización directa de la GFP mediante lámpara de fluorescencia) como la integración del mismo (análisis mediante PCR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experiencia 1. Efecto de diferentes tratamientos espermáticos sobre el desarrollo de embriones transgénicos fecundados por ICSI

- Intacto *vs.* Congelación rápida: No se encontraron diferencias significativas en relación a los porcentajes de división en ambos grupos (control 49/105 (46.7%) vs. 39/101 (38.6%), p= 0.25). Cabe destacar que la división embrionaria se encuentra alrededor de un 40-45%, con unos porcentajes de blastocistos muy bajos para el grupo de los

espermatozoides dañados por congelación. El número de blastocistos obtenidos fue de 25.5% para control y 8.2% para el grupo experimental. En relación a la expresión de los transgénicos, el grupo de los espermatozoides dañados por congelación muestran un aumento significativo de embriones transgénicos (control 50.98 % *vs.* 75.51%, p=0.01), con respecto al grupo control.

- Intacto *vs.* Congelado-descongelado: En los resultados obtenidos para esta experiencia destacamos que no se encontraron diferencias significativas para las variables estudiadas, es decir, división embrionaria por grupos (control 53% vs. 49.4%), porcentaje de blastocistos y de embriones transgénicos (control 37.1% *vs.* 44.9%).

- Intacto *vs.* RecA: En relación a la expresión del gen es de reseñar el alto porcentaje de embriones transgénicos obtenidos para el grupo RecA, próximo al 90% de expresión, destacando que en 7 de los 9 replicados el total de los embriones expresaban el gen. No se encontraron diferencias significativas tanto para la variable división como para el % de blastocistos obtenidos. Los porcentajes de división se encuentran alrededor de un 50% con unos porcentajes de blastocistos muy bajos para ambos grupos, alrededor de un 11%.

De los resultados obtenidos, concluimos que el uso de la transcriptasa inversa protege las cadenas de ADN de posibles degradaciones por lo que el % de embriones transgénicos obtenidos son próximos al 90% con una calidad embrionaria similar al resto de los grupos, resultando el tratamiento más eficaz para la producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos.

Experiencia 2. Inseminación intrauterina profunda con semen incubado con ADN exógeno

Tres de las cuatro cerdas inseminadas fueron diagnosticadas positivas a la gestación a los 25-28 días tras la fertilización. Una vez transcurrido el período de gestación las cerdas parieron a 4, 8 y 10 lechones respectivamente. La cerda nº 2 parió a 8 lechones, 4 de los cuales nacieron muertos y uno murió pocas horas tras el nacimiento. Todos los lechones mostraron unas condiciones fisiológicas y morfológicas normales, se realizó una necropsia a los lechones nacidos muertos para establecer la causa de la muerte, diagnosticando finalmente la asfixia como causa de la misma. Las pruebas realizadas tanto para conocer la expresión como la integración del transgén GFP para cada uno de los lechones, tanto vivos como muertos, nos proporcionaron unos resultados negativos, no resultando ningún animal transgénico.

Al no obtener ningún animal transgénico por este método podemos pensar que los espermatozoides que transportan el transgén tienen mayor dificultad en el movimiento y por lo tanto por competencia fecundarían antes aquellos espermatozoides que no transportan el transgén.

BIBLIOGRAFÍA

- **Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowiski H**. Proc Natl Acad Sci USA 1971 68:353-357.
- **Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD**. Cell. 1989 Oct 20; 59(2):239-41.
- **Garcia-Rosello E, Coy P, Garcia Vazquez FA, Ruiz S, Matas C**. Theriogenology. 2006 Nov; 66 (8):1857-65.
- **Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P**. Theriogenology. 2005 Nov; 64(8):1704-15.
- **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.
- **Smith K, Spadafora C**. Bioessays. 2005 May; 27(5):551-62.