

TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES EN LA ESPECIE PORCINA: EFECTO DE LA PRESENCIA DE ADN EXÓGENO SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *in vivo* DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS

Sperm Mediated Gene Transfer in Pigs: Effect of Exogenous DNA Presence in Seminal Quality and Evaluation of *in vivo* Transgenic Embryo Production

Francisco Alberto García-Vázquez^{1*}, Salvador Ruiz¹, Luis Alberto Grullón¹, Aitor de Ondiz¹, Alfonso Gutiérrez-Adán² y Joaquín Gadea¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España. * Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100-Murcia, España. Tel. +34-868-888009. Fax: +34-868-884147. E-mail: fagarcia@um.es

² Departamento de Reproducción Animal, INIA, Madrid, España.

RESUMEN

Una alternativa biotecnológica para la producción de animales transgénicos es la transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT), basada en la habilidad de las células espermáticas de unir e interiorizar ADN exógeno. En este estudio se plantearon dos objetivos principales: 1) evaluar el efecto de la presencia de ADN exógeno sobre la calidad seminal y 2) evaluar la eficiencia en la producción de embriones transgénicos porcinos *in vivo* mediante inseminación intrauterina quirúrgica con espermatozoides incubados con el transgén. Para alcanzar estos objetivos, los espermatozoides (libres de plasma seminal) fueron incubados en presencia del transgén EGFP (proteína verde fluorescente) durante 2 h a 16°C (en una relación de 10⁸ cels/mL y 5 µg ADN/mL). Se valoró la motilidad, motilidad progresiva e integridad de membrana de los espermatozoides incubados, en presencia o ausencia del transgén. Los resultados mostraron que la presencia del ADN no afectó a ninguno de los parámetros seminales estudiados. Con muestras seminales incubadas con el transgén se llevaron a cabo inseminaciones intrauterinas mediante laparotomía en 4 hembras prepúberes. A los 6-7 días tras la inseminación se recolectaron los embriones, para evaluar la tasa de fecundación y la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP en los mismos. El número medio de cuerpos lúteos por cerda fue de 10,50 ± 2,90 con una tasa de recolección de 11,90%. Se recolectó un total de 5 embriones presentando todos ellos un estado normal de desarrollo y una alta cali-

dad (dos de ellos presentaban más de 400 células por embrión). Cuando fue analizada la expresión mediante microscopia de fluorescencia, ninguno de ellos expresaba la proteína EGFP. Este resultado, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, podría indicar que el transgén se una en su mayoría a espermatozoides con baja viabilidad por lo que la probabilidad de que los espermatozoides vivos unan el ADN y sean capaces de fecundar en comparación con espermatozoides sin el transgén es realmente baja.

Palabras clave: Tecnología reproductiva, vector espermático, inseminación artificial, ADN exógeno, transgénesis, porcino.

ABSTRACT

An alternative technology for producing transgenic animals is sperm mediated gene transfer (SMGT), based on the ability of sperm cells to bind and internalize exogenous DNA. The aims of this work were: 1) evaluate the effects of the presence of exogenous DNA in the seminal quality and 2) evaluate the efficiency of transgenic embryos production by surgery artificial insemination using sperm mediated gene transfer technique. Fresh spermatozoa (removed seminal plasma) were incubated with DNA (EGFP) at 16°C for 2 h (10⁸ cells/mL and 5 µg DNA/mL). At first motility, progressive motility and viability were evaluated in spermatozoa incubated with or without exogenous DNA. The results showed that the presence of the DNA did not affect any of the studied sperm parameters (motility, progressive motility and viability). On the other hand insemination was

carried out in 4 gilts by laparotomy in utero tubaric junction. Six-seven days after insemination blastocysts were collected and fertilization rate and transgene expression were determined. The mean number of corpora lutea/gilt was 10.50 ± 2.90 with a mean recovery rate of 11.90%. After the surgery, a total of 5 embryos were recovered and the percentage of normally developed embryos was 100% and with a high quality (two of them had more than 400 cells). When the blastocysts recovered after 6-7 days post-insemination were analyzed by fluorescence microscopy, it was revealed that none of them expressed protein EGFP. These results show the possibility that exogenous DNA bound to the sperm with low viability and only a low percentage to viable sperm, so the probability that live sperm bind the DNA and are able to fertilize in comparison with live sperm without the transgene are really low.

Key words: Reproductive technology, sperm mediated, artificial insemination, exogenous DNA, transgenic, porcine.

INTRODUCCIÓN

La producción de organismos transgénicos ha sido el mayor avance en el ámbito de la biología en los últimos tiempos, siendo providencial en el estudio de mecanismos genéticos de regulación y desarrollo biológico. Desde su inicio, allá por el año 1981 [13], se han llevado a cabo numerosas mejoras en la tecnología de la transgénesis, siendo diversos los sistemas de transferencia de ADN que se realizan hoy en día, con una gran eficiencia y con un coste reducido, en especial en la especie murina (*Mus musculus*). Desde hace casi dos décadas, el uso de los espermatozoides como vectores de ADN exógeno (transgénesis mediada por espermatozoides: SMGT) ha centrado la atención de numerosos investigadores en un continuo debate sobre la transgénesis animal [25]. En 1989 se demostró la capacidad que tenían los espermatozoides de ratón, de transportar ADN exógeno y transferir estas moléculas al interior del ovocito en el proceso de la fecundación, dando lugar a animales modificados genéticamente [21]. De tal manera, la transgénesis mediada por espermatozoides, debido a su relativa sencillez y bajo costo, podría ser ampliamente utilizada para la producción de animales de granja modificados genéticamente, representando una potente herramienta para la biomedicina. Dicha metodología mejora notablemente la eficiencia que se alcanza al emplear la microinyección pronuclear (0,5-4% de eficiencia) [24], ya que se han obtenido resultados muy esperanzadores próximos a un 80% de animales transgénicos obtenidos [25].

Sin embargo, las dificultades en la repetitividad y la baja eficiencia en la integración de los transgenes en el genoma del animal obtenida con esta tecnología, resultó en una considerable controversia sobre dicho trabajo durante numerosos años [3, 4]. No obstante, son varios los estudios que han sido publicados recientemente en los que se confirma que, los espermatozoides de múltiples especies pueden ser usados como vectores para introducir transgenes dentro del genoma del animal [25].

En la especie porcina (*Sus scrofa*) doméstica, se ha utilizado con éxito esta técnica para producir cerdos transgénicos mediante el uso de la inseminación artificial (IA) [20, 25], o mediante el uso de transferencia de embriones producidos mediante la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) [25]. La aplicación de IA intrauterina permite el uso de un número reducido de espermatozoides [9] al depositar los espermatozoides próximos al lugar de fecundación y evitar el proceso de transporte espermático que se produce a través del tracto reproductor femenino cuando se realiza una IA convencional. La calidad seminal de la muestra determina la capacidad de fecundar los ovocitos y producir embriones viables, por tanto es necesario asegurar, como paso previo, que la incubación de los espermatozoides en presencia de ADN no afecte sustancialmente la calidad seminal.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, los objetivos de este trabajo fueron: en primer lugar, evaluar el efecto de la presencia del ADN exógeno sobre la calidad seminal; y en segundo lugar, evaluar la producción *in vivo* de embriones transgénicos mediante la inseminación intrauterina quirúrgica con espermatozoides incubados con el ADN exógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

El semen utilizado procedió de verracos de fertilidad probada perteneciente al centro de inseminación artificial de la granja "Lo Navarro S.A." (Murcia, España). Los animales estuvieron alojados en habitáculos individuales mantenidos a temperatura controlada (25°C) y bajo condiciones naturales de luz y humedad.

Para las inseminaciones quirúrgicas fueron utilizadas 4 hembras prepúberes, todas ellas Landrace X Large White. Fueron alojadas en jaulas individuales o en parques, con una ración de comida diaria y agua *ad libitum*, con una temperatura ambiental que variaba entre 20-25°C y sometidas a condiciones naturales de luz.

Medio utilizado para el procesado espermático

El medio utilizado para la dilución y lavado de los espermatozoides fue el Swine Fertilization Medium (SFM), descrito previamente por Lavitrano y col. [20]. Este medio está compuesto por glucosa (11,25 gr/L), citrato sódico (10 gr/L), EDTA (4,7 gr/L), ácido cítrico (3,25 gr/L), trizma (6,5 gr/L). Posteriormente fue suplementado con 6 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). El pH final del medio fue ajustado a 6,8 (MicroPH 2002, Cirson Instruments S.A., Barcelona, España).

Construcción del ADN

La proteína verde fluorescente GFP es una proteína que proviene de la medusa *Aequorea victoria* que da lugar a fluorescencia verde cuando es expuesta a luz azul. La variante

mutada verde EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) es la forma mutada más utilizada [10, 19, 23]. Esta variante tiene una intensidad de fluorescencia 20 a 35 veces superior respecto del tipo salvaje de GFP [14], y es la que se ha utilizado en el presente estudio.

La construcción del gen que codifica la EGFP se detalla a continuación: El plásmido pEGFP-N1 contiene el promotor temprano CMV (citomegalovirus) humano y el gen EGFP (pEGFP-N1, 5,7 Kpb, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, EUA). El polilinker pEGFP-N1 fue eliminado y un adaptador Bcl I-Hind III fue insertado en el sitio Afl II. El plásmido se hizo lineal mediante el uso de Afl II. Posteriormente, se purificó usando el kit Elu-Quit DNA Purification (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Finalmente, el ADN fue resuspendido en TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8).

Recogida del semen y procesado de espermatozoides

La recogida de semen se realizó mediante el método manual [18]. La primera fracción del eyaculado (concentración baja de espermatozoides) fue eliminada, y la fracción rica en espermatozoides fue recogida en un termo estéril precalentado a 37°C (para evitar el choque térmico) y filtrada mediante gases estériles para descartar las secreciones de la glándula de Cowper. Inmediatamente, tras la recolección del eyaculado, el semen fue diluido 1:1 en medio SFM sin BSA (Bovine Serum Albumine), precalentado a 37°C en baño atemperado (Nüve Bm 402, Sanayi, Ankara, Turquía).

El semen fue preparado mediante el método descrito por Lavitrano y col. [20]. 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 en un termo eléctrico (AMS FH-15, China) a 37°C. Una vez en el laboratorio, se diluyó de nuevo en medio SFM (37°C) en una proporción de 1:10 (5 mL semen 1:1 + 45 mL medio) en tubos Falcon®, y se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C (Centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf Ibérica S.L. Madrid, España).

Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en SFM (en este caso con BSA) a 25°C, de nuevo se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C; se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL del medio con BSA a 25°C. Se evaluó la motilidad una vez acabado el procesado de los espermatozoides (debiendo alcanzar para su uso una motilidad superior al 65%, y una motilidad progresiva no inferior a 2,5) y se calculó la concentración final mediante un sistema espectrofotométrico (SpermaCue®, Minitub, Alemania). Finalmente, se ajustó la concentración de la suspensión espermática a 10⁸ células espermáticas/mL a los que se le añadió 5 µg de ADN exógeno/mL (solución stock de ADN 200 ng/µL).

Evaluación de la calidad seminal

La motilidad se evaluó mediante la observación en microscopio (Nikon® YS100, Japón) de campo claro con objetivo 10X, depositando 10 µL de la muestra sobre un portaobjetos

precalentado en una placa térmica atemperada a 38°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y la motilidad progresiva en una escala de 0 a 5, de acuerdo a la presencia de espermatozoides con movimiento rectilíneo, progresivo y rápido.

La integridad de membrana se valoró incubando los espermatozoides en una solución que contenía 20 µL de una solución stock de diacetato de carboxifluoresceína (DCF) [0,46 mg/mL DCF en dimetil-sulfóxido (DMSO)], a la cual se le añadió 20 µL de solución de yoduro de propidio (IP) [IP en solución salina fisiológica (SSF) 500 µg/mL], 10 µL de SS formolada, 100 µL de la muestra de semen y 900 µL de SSF [15]. Esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 10 min en un lugar protegido de la luz. Pasado este tiempo se colocaron 10 µL de la solución final en un portaobjetos y bajo un cubreobjetos. Finalmente, se valoró mediante microscopía de fluorescencia (Leica® modelo DMLS, Alemania) con un filtro de excitación a 580 nm bajo objetivo de inmersión (100X). Se clasificaron los espermatozoides observados en dos grupos: 1) Células con fluorescencia verde: Integridad de membrana intacta; 2) Células con fluorescencia roja: Integridad de membrana alterada.

Manejo reproductivo de las cerdas prepúberes

Para la inducción del celo y superovulación se administró vía intramuscular (i.m.) 1250 U.I de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Folligon®; Intervet) seguidos 72 h después de 750 U.I de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Veterin Corion®, Divisa Farmavic S.A., Barcelona). La detección del estro fue llevada a cabo cada 6 h a partir de 32 h tras la inyección de hCG, mediante determinación del reflejo de inmovilidad, observación del aspecto que presentaba la vulva, y confirmado mediante el uso de técnicas ultrasonográficas (100 Falco-Vet, Esaote, S.A., Barcelona, España) dotado con sonda endorrectal (6-8 MHz).

Inseminación intrauterina por laparotomía y recolección de embriones

Anestesia y analgesia

La inducción anestésica y analgesia preoperatorias de los animales fue realizada mediante la administración de una combinación de ketamina (100 mg/mL) 10 mg/Kg (Imalgene® 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, España), medetomidina (1,0 mg) 0,2 mg/kg (Domtor®, Pfizer S.A., Madrid, España), midazolam (5 mg/5mL) 0,2 mg/kg (Dormicum®, Roche, Madrid, España), morfina hidrocloreto (20 mg/mL) 0,2 mg/kg (morfina braun 2%, B. Braun Medical S.A., Barcelona, España) vía i.m. hasta alcanzar un plano anestésico que permitiera conectar al animal al equipo de anestesia inhalatoria (Matrx®) mediante el uso de una mascarilla, manteniendo el plano anestésico con isoflurano (Isoflo®, Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, España) vaporizado en oxígeno al 2-3%. Para la analgesia postoperatoria se administró morfina 0,2 mg/kg i.m. cada 4 h hasta transcurridas 8-12 h del postoperatorio, continuando la analgesia con buprenorfina (0,3 mg/mL) 0,01 mg/kg i.m. (Buprex®, Schering-Plough, S.A., Madrid, España) cada 8 h durante 3-4 días.

Inseminación intrauterina quirúrgica.

En la ampolla oviductal de cada cuerno uterino se aplicó una dosis de inseminación que contenía $1,5 \times 10^8$ espermatozoides y 75 μL ADN (solución stock de EGFP 200 ng/ μL), en un volumen final de 1,5 mL [9]. Estas muestras espermáticas estuvieron incubadas previamente durante 2 h a 16°C y cada 20 minutos y de forma repetida se inclinaron los tubos para evitar la sedimentación.

Una vez realizada la apertura de la cavidad abdominal, se observaron con detenimiento los ovarios para asegurar que la cerda había completado el proceso de ovulación y se determinó el número total de los cuerpos hemorrágicos presentes. A continuación, se localizó el oviducto donde se realizó una incisión utilizando una aguja roma para acceder a la ampolla oviductal (FIG. 1a), donde fueron depositados los espermatozoides (37°C).

Recogida de embriones y valoración del desarrollo embrionario

A los 6-7 días tras la inseminación quirúrgica, se procedió a la recogida de los embriones. Tras la apertura y acceso a la cavidad abdominal, se realizó una ovariectomía y el tracto reproductivo se conservó en solución salina fisiológica atemperada hasta su traslado al laboratorio (10 min.). A su vez se contaron los cuerpos lúteos presentes en cada uno de los ovarios, para calcular posteriormente el ratio de recogida embriones/cuerpos lúteos.

Una vez en el laboratorio, se realizaron dos lavados inyectando 20 mL de medio PBS [suplementado con 1 mg/mL de alcohol polivinílico (PVA), precalentado a 37°C] en cada uno de los cuernos en dirección oviducto-útero y recogido en placas de Petri.

Los embriones recolectados se aislaron bajo el estereomicroscopio (Motic® SMZ168, Motic China group Co, Ltd., China) (5X) y se dispusieron en PBS atemperado. Seguidamente, se procesaron para valorar la calidad embrionaria según el número de blastómeras por embrión siguiendo la técnica descrita por Dobrinsky y col. [8]. Los blastocistos se fijaron en alcohol etílico sobre un portaobjetos durante un período de 24 h y posteriormente se tiñeron con una solución Hoescht 33342 al 1% en PBS para teñir los núcleos celulares. Tras la tinción, los embriones se visualizaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia (Leica modelo DMLS, Alemania) a 400X y filtro UV de 495 nm de longitud de onda. Por último, se contabilizaron todos los núcleos considerándose el número total de células por blastocisto como el número total de núcleos teñidos (FIG. 1b). Las variables estudiadas fueron: 1) Tasa de formación de blastocistos (% blastocistos): número de blastocistos en relación al número total de embriones recolectados, 2) Número medio de células por blastocisto (N° cels/blastocisto).

Análisis de la expresión de EGFP

Los embriones obtenidos fueron observados en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon® Diaphot 300, Ja-

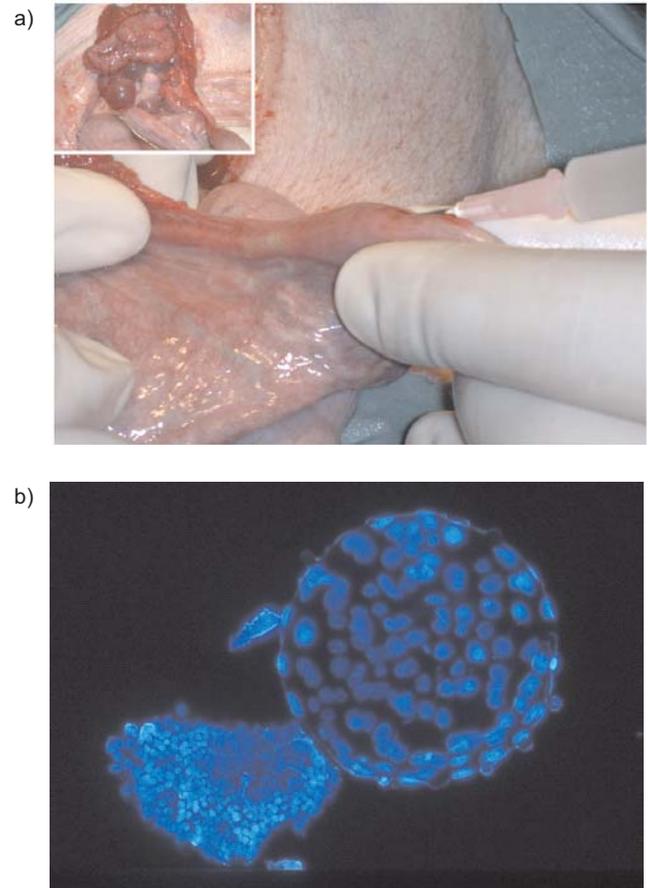


FIGURA 1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAUTERINA POR LAPAROTOMÍA. (A) INSEMINACIÓN EN LA AMPOLLA OVIDUCTAL CON ESPERMATOZOIDEOS INCUBADOS CON ADN. (B) BLASTOCISTO OBTENIDO 7 DÍAS DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN QUIRÚRGICA Y TEÑIDOS CON HOESCHT 33342 PARA VISUALIZAR LOS NÚCLEOS DE LAS BLASTÓMERAS (40X)./ INTRAUTERINE ARTIFICIAL INSEMINATION BY LAPAROTOMY. (A) OVIDUCTAL AMPULLA INSEMINATION WITH SPERMATOZOA INCUBATED WITH TRANSGENE. (B) ONE OF THE BLASTOCIST OBTAINED 7 DAYS AFTER SURGERY INSEMINATION AND STAINED WITH HOESCHT 33342 TO IDENTIFY THE BLASTOMERES (40X).

pón) con un rango de excitación de 395-470 nm y un espectro de emisión de 509 nm para detectar la posible expresión de la proteína verde fluorescente EGFP.

Diseño experimental

Experiencia 1. Evaluación de la calidad seminal en presencia de ADN exógeno.

Los espermatozoides fueron coincubados con ADN (EGFP), en la relación 1×10^8 espermatozoides/mL + 5 μg ADN/mL, durante 2 h a 16°C . Se evaluó si la presencia del ADN exógeno alteraba la calidad seminal. Para ello, se dividieron los espermatozoides en dos grupos: a) espermatozoides

no incubados con el transgén (control), b) espermatozoides incubado con el transgén (ADN). En ambos grupos se evaluó de cada muestra tanto la motilidad y la motilidad progresiva, como la integridad de membrana valorada por la tinción DCF-IP. Dichos parámetros fueron evaluados a las 0; 1 y 2 h tras el inicio de la incubación. Se hicieron un total de 3 replicados por cada macho (de un total de 5 machos utilizados).

Experiencia 2. Evaluación de la producción de embriones transgénicos mediante inseminación intrauterina quirúrgica

Los espermatozoides una vez procesados fueron incubados con el transgén (EGFP) en la relación $1,5 \times 10^8$ espermatozoides/75 μ L ADN (solución stock de ADN de 200 ng/ μ L), en un volumen final 1,5 mL, durante 2 h a 16°C. Las inseminaciones se llevaron a cabo en 4 cerdas mediante laparotomía. A los 6-7 días tras la inseminación se recolectaron los embriones y se evaluó el número de cuerpos lúteos por ovario, número de embriones recolectados, tasa de recogida de embriones, desarrollo embrionario, calidad embrionaria y expresión del transgén en los embriones.

Análisis estadístico

Se muestran los valores medios y el error estándar de la media de los parámetros estudiados. Se realizó un estudio de ANOVA de una vía donde el factor fijo fue la presencia o ausencia de ADN y el tiempo de incubación. Se consideraron diferencias significativas si $P < 0,05$. Se utilizó el programa Systat v11 (Systat Software Inc., 2004. Richmond, CA, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al estudiar el efecto de la presencia del ADN sobre la calidad seminal a lo largo de 2 h, se encontró, que la presencia del ADN no afectó a ninguno de los parámetros seminales estudiados (motilidad, motilidad progresiva y viabilidad), (TABLA I). Dichos parámetros de calidad seminal fueron decreciendo a lo largo del tiempo de incubación, presentándose diferencias significativas entre los valores medidos a las 0 y 2 h de incubación ($P < 0,01$). Finalmente es de destacar que se encontró un efecto significativo del macho utilizado sobre los parámetros de motilidad y viabilidad evaluados ($P < 0,01$).

Los resultados obtenidos de este estudio coinciden con los descritos en otros trabajos donde confirman que los espermatozoides de toro (*Bos taurus-indicus*) y cerdo mantienen su motilidad al ser incubados con el transgén [1, 16]. Además es interesante reseñar que en otro trabajo previamente publicado [6], los espermatozoides incubados con el transgén aumentan su motilidad total y motilidad progresiva en relación a las células no tratadas (control). Pero existen ciertos aspectos controvertidos al respecto, así otros autores [2] encuentran una reducción significativa en el porcentaje de células viables en las muestras bovinas incubadas con ADN frente al control (32 vs. 27%, $P < 0,01$). Al igual que Gandolfi y col. [11], quienes describen que, tras el lavado de los espermatozoides de verraco y

TABLA I
PARÁMETROS SEMINALES (MOTILIDAD, MOTILIDAD PROGRESIVA Y VIABILIDAD) DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS EN PRESENCIA DE ADN O AUSENCIA DE ADN EXÓGENO (CONTROL). VALORES TRAS UN PERIODO DE INCUBACIÓN DE 2 H/ SEMINAL PARAMETERS (MOTILITY, PROGRESSIVE MOTILITY AND VIABILITY) OF SPERMATOZOA INCUBATED IN PRESENCE (DNA) OR ABSENCE (CONTROL) OF EXOGENOUS DNA. VALUES AFTER 2 H OF INCUBATION.

	Motilidad (%)	Motilidad progresiva (0-5)	Viabilidad (DCF/IP) (%)
ADN	72,27 \pm 1,35	2,50 \pm 0,09	81,32 \pm 0,85
Control	70,00 \pm 2,59	2,41 \pm 0,09	80,61 \pm 0,91
P-value	0,93	0,43	0,39

su incubación con ADN exógeno, sólo un pequeño porcentaje (5-20%) de los espermatozoides presentaban motilidad y la calidad de ésta era baja (0,5-3, en una escala arbitraria entre 0-5). Tampoco se encontraron diferencias en la viabilidad espermática entre el grupo control y el grupo de espermatozoides incubados con el ADN, del mismo modo que los resultados obtenidos por Kang y col. [16]. Por otra parte, como era de esperar, durante el tiempo de incubación creciente (0; 1 y 2 h) se produjo un descenso de la calidad seminal de todas las muestras, tanto las incubadas con ADN como las del grupo control.

Cuando se analizaron los blastocistos recogidos a los 6-7 días tras aplicar inseminaciones quirúrgicas, ninguno de ellos expresó la proteína EGFP (TABLA II). El número medio de cuerpos lúteos por cerda fue de $10,50 \pm 2,90$ y se recogieron un total de 5 embriones, todos ellos en estadio de blastocisto, lo que supone una tasa de recogida de un 11,90%, siendo el porcentaje de embriones normales desarrollados del 100%, con una alta calidad en cuanto a su desarrollo (dos de ellos tenían más de 400 células). Es sabido que la calidad embrionaria, medida por el número de células por embrión, es mayor en aquellos embriones producidos *in vivo* que los obtenidos *in vitro*. Así, Wang y col. [26], al comparar la calidad embrionaria en blastocistos de 6 días obtenidos *in vitro* e *in vivo*, encontraron que el número de células por blastocisto era muy superior en estos últimos (37,3 vs. 164,5).

Los resultados del presente estudio contrastan con los obtenidos por Fantinati y col. [9], quienes utilizando dosis de inseminación similares a las de este trabajo ($1,5 \times 10^8$ espermatozoides/1,5 mL) y aplicando una técnica de laparoscopia en lugar de laparotomía, obtuvieron un porcentaje de blastocistos que expresaban EGFP del 80% tras inseminar un total de 5 hembras. Posteriormente, Webster y col. [27] obtienen cerdos multi-transgénicos aplicando esta técnica. En el análisis de la integración de los genes en los 18 lechones obtenidos, observaron que el gen EGFP estaba integrado en el 44% de la descendencia, mientras que los genes EBFP y DsRed2 estaban en más del 85%. En la misma línea, Chang y col. [7] obtienen

TABLA II

RESULTADOS DE FECUNDACIÓN POR INSEMINACIÓN INTRAUTERINA QUIRÚRGICA CON SEMEN INCUBADO CON ADN EXÓGENO. RESULTADOS DE LA RECOGIDA DE LOS EMBRIONES A LOS 6-7 DÍAS TRAS LA INSEMINACIÓN/ IN VIVO EMBRYO PRODUCTION BY SURGERY INTRAUTERINE ARTIFICIAL INSEMINATION WITH SPERMATOZOA PREVIOUSLY INCUBATED WITH EXOGENOUS DNA. RECOVERY OF EMBRYOS AFTER 6-7 DAYS POST-INSEMINATION.

	Cuerpos lúteos (por ovario)	Nº embriones recolectados	Ratio recogida embriones (%)	Nº blastocistos (%)	Nº células/ blastocisto	Expresión EGFP (%)
Cerda 1	8 (5/3)	0	0 (0)	-	-	-
Cerda 2	6 (6/0)	3	3/6 (50)	3 (50)	34,67 ± 2,85	0 (0)
Cerda 3	9 (7/2)	2	2/9 (22,2)	2 (22,2)	>400	0 (0)
Cerda 4	19 (11/8)	0	0 (0)	-	-	-
Valores medios	(42/4) 10,50 ± 2,90	(5/4) 1,25 ± 0,75	(5/42) 11,90%	(5/5) 100%	180,80 ± 89,50	

un 13% de cerdos transgénicos utilizando la inseminación oviductal quirúrgica y haciendo uso de anticuerpos que se establecen como nexo de unión entre el plásmido y el espermatozoide.

Una de las posibles causas del bajo éxito de obtención de embriones tras la inseminación quirúrgica puede deberse, a la baja respuesta del tratamiento hormonal que mostraron las hembras, ya que si observan los resultados en 3 de ellas, al menos uno de los ovarios tuvo una respuesta hormonal muy escasa. Aunque en diversos trabajos la estimulación hormonal en cerdas prepúberes resultó satisfactoria [17, 28], uno de los principales problemas en usar este tipo de animales como modelo experimental es la respuesta a la superovulación, la cual puede ser pobre y en algunos casos altamente variable y difícil de predecir [5].

Diversos autores han demostrado que la técnica de SMGT es efectiva utilizando inseminaciones artificiales, ya sean quirúrgicas o no, pero no ocurre lo mismo bajo las condiciones experimentales del presente estudio. En la bibliografía se han descrito resultados controvertidos en cuanto a la técnica de SMGT [3, 4, 11, 12]. Para explicar los resultados obtenidos, se pueden plantear dos hipótesis: la primera de ellas podría deberse a que la mayor parte de la unión de las moléculas de ADN y espermatozoides, se produce en células muertas o con alteraciones graves de la membrana [12] y en consecuencia, células poco viables para poder desarrollar el proceso de fecundación. Es verosímil que la alteración o fractura de la membrana espermática favorezca la interacción con el ADN y permita fijarse a la región perinuclear. La segunda hipótesis planteada conlleva a que la unión al ADN induzca la alteración y muerte del espermatozoide por la activación de las endonucleasas. Cuando las nucleasas son activadas por la presencia del ADN exógeno, catalizan la degradación localizada del ADN cromosómico del espermatozoide. La degradación del ADN y la modulación de la actividad de las nucleasas nos recuerdan a la apoptosis asociada al ADN descrita en las células somáticas [23] y consecuentemente llevan a la muerte celular [22]. La apoptosis de la célula espermática podría ser por tanto, un mecanismo natural para prevenir la transmisión de ADN exógeno a la siguiente generación [2]. Esa degradación del ADN

podría disminuir la posibilidad de que los espermatozoides transporten el ADN exógeno en los procesos de fecundación [16]. En resultados previos obtenidos en el laboratorio se han producido embriones porcinos viables, que expresaban la proteína EGFP, mediante ICSI utilizando espermatozoides con graves alteraciones de membrana (sometidos a procesos de congelación-descongelación sin crioprotectores) e incubados con ADN exógeno [12].

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

En este trabajo se ha demostrado que, la presencia de ADN exógeno no afecta a la calidad espermática. Sin embargo, no se ha producido ningún embrión que exprese la EGFP mediante la inseminación intrauterina, lo que indica la posibilidad de que el transgén se una, en su mayoría, a espermatozoides con una baja viabilidad lo cual reduce la probabilidad de fecundación mediante inseminaciones, bajo condiciones experimentales.

En cualquier caso, es necesario profundizar en el estudio de los diferentes factores que afectan al proceso para poder comprender el mecanismo de unión entre los espermatozoides y el ADN exógeno.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue subvencionado por los proyectos BIO-CARM 10BIO2005/01-6463 y MEC-FEDER AGL2006-03495.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALDERSON, J.; WILSON, B.; LAIBLE, G.; PFEFFER, P.; L'HUILLIER, P. Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. **Anim. Reprod. Sci.** 91:23-30. 2006.
- [2] ANZAR, M.; BUHR, MM. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. **Theriogenol.** 65: 683-690. 2006.

- [3] BIRNSTIEL, ML.; BUSSLINGER, M. Dangerous liaisons: spermatozoa as natural vectors for foreign DNA? **Cell**. 57:701-702. 1989.
- [4] BRINSTER, RL.; CHEN, HY.; TRUMBAUER, M.; SE-NEAR, AW.; WARREN, R.; PALMITER, RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. **Cell**. 27:223-231. 1981.
- [5] BRUSSOW, KP.; TORNER, H.; KANITZ, W.; RATKY, J. *In vitro* technologies related to pig embryo transfer. **Reprod. Nutr. Dev.** 40:469-480. 2000.
- [6] CHAN, PJ. Sperm-mediated DNA transfer to cells of the uterus and embryo. **Mol. Reprod. Dev.** 56:316-318. 2000.
- [7] CHANG, K.; QIAN, J.; JIANG, M.; LIU, YH.; WU, MC.; CHEN, CD.; LAI, CK.; LO, HL.; HSIAO, CT.; BROWN, L.; BOLEN, J. JR.; HUANG, HI.; HO, PY.; SHIH, PY.; YAO, CW.; LIN, WJ.; CHEN, CH.; WU, FY.; LIN, YJ.; XU, J.; WANG, K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. **BMC Biotechnol.** 2:5. 2002.
- [8] DOBRINSKY, JR.; JOHNSON, LA.; RATH, D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. **Biol. Reprod.** 55:1069-1074. 1996.
- [9] FANTINATI, P.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; WEBSTER, N.; LAVITRANO, M.; FORNI, M.; SEREN, E.; BACCI, ML. Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. **Theriogenol.** 63:806-817. 2005.
- [10] FURTADO, A.; HENRY, R. Measurement of green fluorescent protein concentration in single cells by image analysis. **Anal. Biochem.** 310:84-92. 2002.
- [11] GANDOLFI, F.; TERQUI, M.; MODINA, S.; BREVINI, TA.; AJMONE-MARSAN, P.; FOULON-GAUZE, F.; COUROT, M. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. **Reprod. Fertil. Dev.** 8:1055-1060. 1996.
- [12] GARCÍA-VÁZQUEZ, F. Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina: factores que afectan a la eficiencia de la técnica. Servicio de publicaciones Universidad de Murcia. Base de Datos de Tesis de Grado (TDR). 1-414 pp. 2008.
- [13] GORDON, JW.; RUDDLE, FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**. 214:1244-1246. 1981.
- [14] HADJANTONAKIS, AK.; COX, LL.; TAM, PP.; NAGY, A. An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta. **Gen.** 29:133-140. 2001.
- [15] HARRISON, RA.; VICKERS, SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 88:343-352. 1990.
- [16] KANG, JH.; HAKIMOV, H.; RUIZ, A.; FRIENDSHIP, RM.; BUHR, M.; GOLOVAN, SP. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. **Theriogenol.** 70: 1288-1296. 2008.
- [17] KAPELANSKI, W.; ZIECIK, AJ.; DYBALA, J.; RAK, B.; KAPELANSKA, J. Effect of diet enhancing insulin secretion and hormonal stimulation of the first and second estrus on reproductive performance in gilts. **Medycyna Wet.** 59: 546-549. 2003.
- [18] KING, GJ.; MACPHERSON, JW. A comparison of two methods for boar semen collection. **J. Anim. Sci.** 36:363-365. 1973.
- [19] KUSSER, KL.; RANDALL, TD. Simultaneous detection of EGFP and cell surface markers by fluorescence microscopy in lymphoid tissues. **J. Histochem. Cytochem.** 51:5-14. 2003.
- [20] LAVITRANO, M.; BACCI, ML.; FORNI, M.; LAZZERESCHI, D.; DI STEFANO, C.; FIORETTI, D.; GIANCOTTI, P.; MARFE, G.; PUCCI, L.; RENZI, L.; WANG, H.; STOPPACCIARO, A.; STASSI, G.; SARGIACOMO, M.; SINIBALDI, P.; TURCHI, V.; GIOVANNONI, R.; DELLA CASA, G.; SEREN, E.; ROSSI, G. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99:14230-14235. 2002.
- [21] LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, VM.; DOLCI, S.; FARACE, MG.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. **Cell**. 57:717-723. 1989.
- [22] MAIONE, B.; PITTOGGI, C.; ACHENE, L.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. **DNA. Cell. Biol.** 16:1087-1097. 1997.
- [23] NAKANISHI, T.; KUROIWA, A.; YAMADA, S.; ISOTANI, A.; YAMASHITA, A.; TAIRAKA, A.; HAYASHI, T.; TAKAGI, T.; IKAWA, M.; MATSUDA, Y.; OKABE, M. FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome. **Genom.** 80:564-574. 2002.
- [24] NIEMANN, H.; KUES, WA. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. **Anim. Reprod. Sci.** 79:291-317. 2003.
- [25] SMITH, K.; SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. **Bioessays.** 27:551-562. 2005.

- [26] WANG, WH.; ABEYDEERA, LR.; HAN, YM.; PRATHER, RS.; DAY, BN. Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced *in vitro* and *in vivo*. **Biol. Reprod.** 60:1020-1028. 1999.
- [27] WEBSTER, NL.; FORNI, M.; BACCI, ML.; GIOVANNONI, R.; RAZZINI, R.; FANTINATI, P.; ZANNONI, A.; FUSETTI, L.; DALPRA, L.; BIANCO, MR.; PAPA, M.; SEREN, E.; SANDRIN, MS.; MCKENZIE, IFC.; LAVITRANO, ML. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. **Mol. Reprod. Dev.** 72:68–76. 2005.
- [28] ZIECIK, AJ.; BIALLOWICZ, M.; KACZMAREK, M.; DEMIANOWICZ, W.; RIOPEREZ, J.; WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Influence of estrus synchronization of prepubertal gilts on embryo quality. **J. Reprod. Dev.** 51:379-84. 2005.