

ORTEGA, NICOLAS MATI

Desarrollo de estrat

33077

2015

73957



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN



**“DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA GENERAR
FIBROBLASTOS FETALES BOVINOS
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS Y EMBRIONES
BOVINOS TRANSGÉNICOS MEDIANTE INYECCIÓN
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES
(ICSI)”**

Lic. ORTEGA Nicolás Matías

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la
Universidad Nacional de Río Cuarto

Director: Dr. BOSCH Pablo

Co-Director: Dr. MUTTO Adrián Ángel

2015

73957

MFN:
Clasif:
T.924

**Se anexa un CD que contiene el trabajo de Tesis en formato electrónico
(TesisORTEGA.pdf)**

“The important thing is not to stop questioning” -Albert Einstein

Son muchas las personas que debería nombrar en estas líneas, que incondicionalmente siempre me han apoyado, tanto a lo largo del desarrollo de esta Tesis como a lo largo de mi vida, espero no olvidarme de nadie... Este título es gracias a todos ustedes!

A mis Papas, Vivi y Juan por criarme con libertad, darme la posibilidad de estudiar lo que me gustaba, demostrarme lo lindo que es soñar y trabajar duro para hacer nuestros sueños realidad. Enseñarme a tener metas y a no bajar los brazos ante las adversidades. Los amo!

A mis hermanos Carito, Juanma y Mayluz por ser como son y compartir conmigo mi vida entera!

A Valentina, mi sobrina favorita que nos ilumina con su energía y su amor,

A mis Abuelos, Longa y Ruthy por malcriarme una y otra vez, AMOR

A mis tíos y mis primos de Neuquén, mi segunda Familia!

A Adrián Mutto, gracias por ser un pilar en mi corta carrera, por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio tan amablemente en un momento en que mi destino necesitaba un cambio radical. Infinitas gracias por alentarme a continuar, y estar siempre pensando en lo mejor para mí, brindándome herramientas, reactivos, oportunidades, soluciones, contactos, trabajo, en fin, un grande, el mejor de los jefes si lo hay, gracias a él sin dudas esto está finalmente sucediendo!

A Carolina Herrera por tratarme como un par, por enseñarme todo lo que se de ICSI que con SUBORDINACIÓN Y VALOR todo se puede, pero además por trascender los límites de la mesada y convertirse en una amiga!!!

A Vicky Dardanelli por ser mi asesora y consejera, prestar el oído y estar presente siempre, incluso a la distancia.....Muy muchas gracias amiga!

A Tomasso, un grande, compañero y amigo.....Genio!

A mis amigos y compañeros de Laboratorio, Enano, Ely, Sabrítez, Flora, Rochester, Majo, Brenda, Bety, Clauchi, Luli, Mica, Maga por estar siempre bien predisuestos a ayudar.

A las divinas de Luján Romi, Juli, por ser las proveedoras de ovocitos equinos

A mis amigos de Neuquén, Anita Eunice, Val, Eve, Lau, Sil, Canú, Fillippi, Runa, Fede, Erica, Eliana, Madya, Pato, Yani, Yoni, Tuty

A mis amigos de San Luis, Toda la Pro-Biomol '09 (Lolo, Joseph, Cintia, Lucía, Carito, Gise, Carlita, Luciana, Veritu, Lore, Vitu, Leandro, Antonio). Euge, Naty, Gusty, Yamila Gym, Maricel con C,

A mis amigos de Rio Cuarto, La Negra Lorena, Nico, Jimenilla y sus familias, Facundoto, Anita W, Paolite, Germancete, Gastón, Vani, Flor Pansa, Laurilla Milla, Doble U, Luigi, Rocha, Jime M, Cintia Paisio, Marichele, Genevieve, Vero,

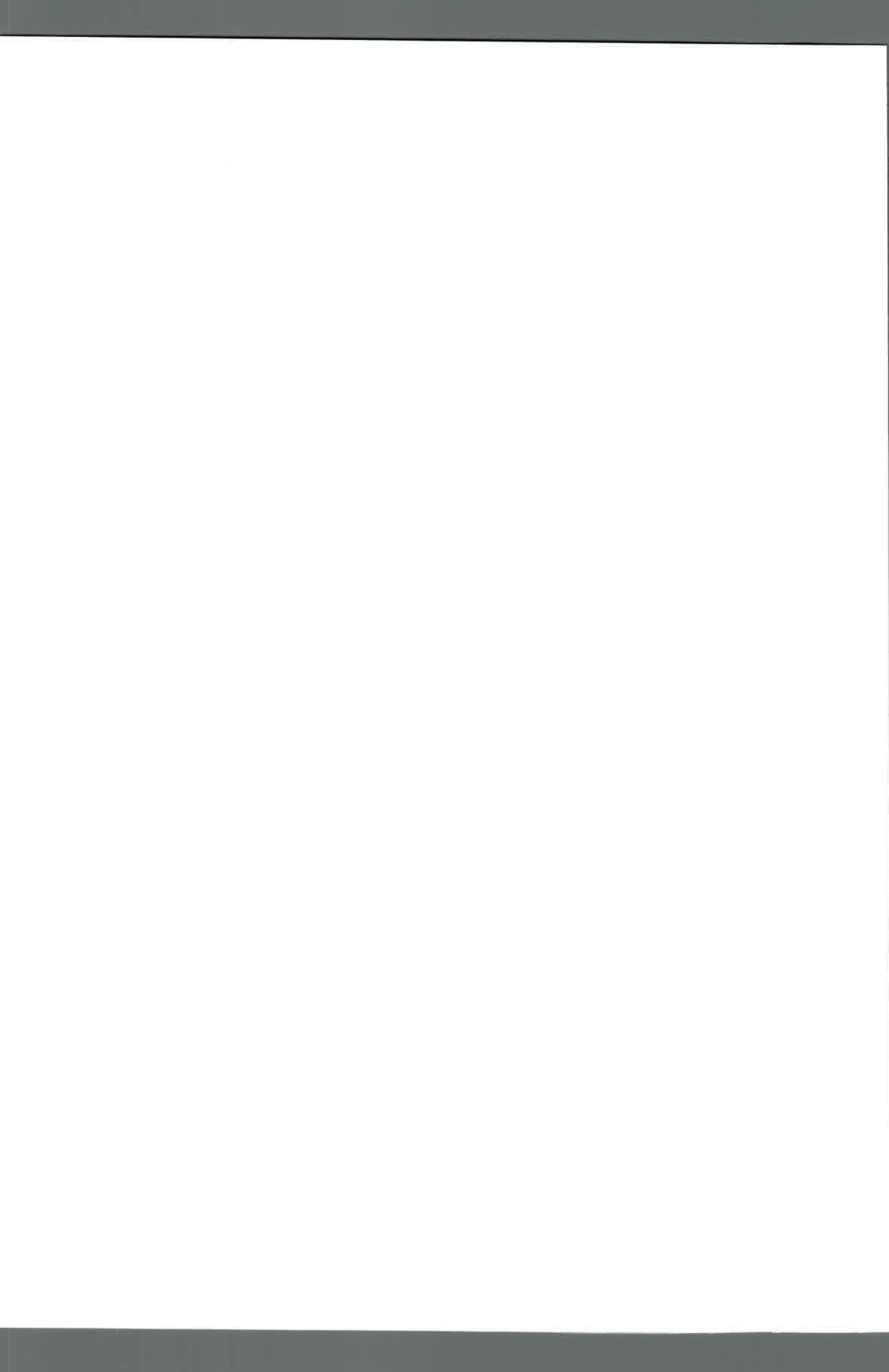
A mis amigos de Buenos Aires, Tzsu, Chochis, Ninio Fer, Revorita, Sole, Paula Violeta, Chaneta, Mati G, Lucila, Gaby Buffa, Valen, Peter, Cintia, Laura, Anabel, Meli, Marianela, Lorena, Gabicita, Vicky Pepe, Mariela, Diego, Luciano, Alita

A mis compañeros de la casona Maxi, Maider, Luchino,

A Santiago y a su Familia por los bellos momentos compartidos!

A Fede y a Nelly por sus chipás,

A la gente de la UNSL, UNRC y de la UNSAM...GRACIAS TOTALES!!!

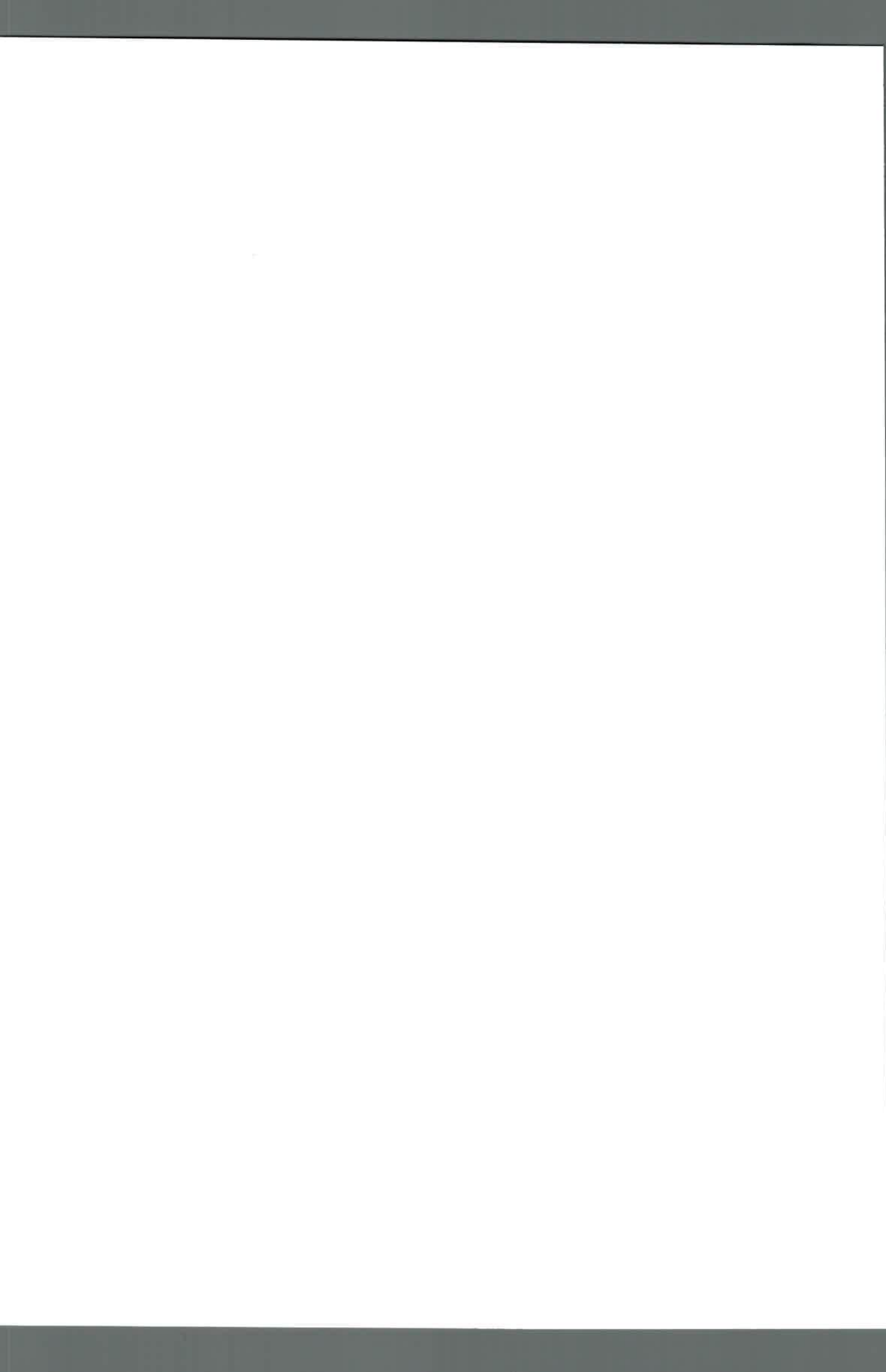


Resumen

La ingeniería genética y la reprogramación de organismos vivos representan las nuevas fronteras biotecnológicas que permitirán generar animales con modificaciones precisas en sus genomas para un sinnúmero de aplicaciones biomédicas y agropecuarias. Es así que, el presente proyecto persiguió desarrollar y optimizar protocolos para generar embriones bovinos transgénicos.

Capítulo I: La estrategia propuesta, se basaba en conseguir la presencia simultánea en el interior celular de una enzima de restricción (*I-SceI*) más un transgén (formado por casetes de expresión de una proteína fluorescente -ZsGreen1- y neomicina fosfotransferasa) flanqueado por sitios para la endonucleasa. Se generaron varias líneas transgénicas de fibroblastos fetales bovinos mediante sub-cultivo de las colonias fluorescentes en placas individuales. Las células transgénicas fueron empleadas para generar embriones modificados genéticamente por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). Adicionalmente, estudiamos se generaron embriones bovinos transgénicos mediante la incorporación del transgén (casetes ZsGreen1 y neo) flanqueado por sitios *I-SceI* más la enzima *I-SceI* al interior del ovocito junto con el espermatozoide durante la técnica conocida como inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Los embriones así generados se cultivaron *in vitro*, inspeccionándolos a los días 4, 6 y 7 para detectar la emisión de fluorescencia, indicativa de la expresión de la proteína ZsGreen1. Los embriones que alcanzaron el estado de blastocisto y expresaron el transgén fueron estudiados para determinar la presencia del transgén mediante el análisis de su ADN.

Capítulo II: Decidimos proponer un tratamiento de maduración ovocitaria bifásico mediante el uso de moduladores de AMPc. Este tratamiento consta de dos etapas, en la primera se intenta aumentar la concentración intracelular de este mensajero químico mediante el uso de Forscolina e IBMX, con el fin de evitar el reinicio prematuro de la meiosis. En la segunda etapa, se busca evitar la degradación del AMPc producido mediante el uso de Cilostamida, induciendo a su vez la maduración de los ovocitos mediante la utilización de FSHrh. Se logró estandarizar la maduración bifásica *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de ovarios de mataderos. Estos resultados sugieren que el uso de moduladores de AMPc durante el proceso de maduración genera



ovocitos de mayor competencia ovocitaria, lo que se refleja en el aumento de la productividad y calidad de los embriones producidos. Este tratamiento se propone entonces como una alternativa a los protocolos de maduración estándares utilizados en PIV de embriones bovinos y otras especies de interés zootécnico.

Palabras clave: ganado bovino, embrión, I-SceI, endonucleasa, transgénesis, ICSI, ovocito, maduración, AMPc, PIV

Abstract

Genetic engineering and reprogrammed organisms represent the new biotechnological frontiers which will make possible to generate animals with precise genetic modifications for agricultural and biomedical applications. Therefore, we developed and optimized protocols to produce transgenic bovine embryos

Chapter I: The strategy involves the simultaneous presence inside the cell of a restriction enzyme (I-SceI) and a transgene (carrying cassettes for a fluorescent protein - ZsGreen1- and neomycin phosphotransferase) flanked by restriction sites for the endonuclease. Several transgenic cell lines were generated and used to generate genetically modified animals through somatic cell nuclear transfer (SCNT). In addition, we have developed an alternative approach to generate transgenic bovine embryos by coinjecting the transgene flanked by I-SceI restriction sites plus the enzyme I-SceI along with the spermatozoon during the technique known as intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Embryos were cultured *in vitro* and inspected at days 4, 6 and 7 with a fluorescence microscope to characterize transgene expression. Embryos that reach the blastocyst stage and express the transgene were analyzed to determine transgene presence.

Chapter II: Our objective was to set up a biphasic maturation treatment by using cyclic adenosine monophosphate modulators (cAMP). This treatment has two phases, in the first phase, we try to yield an increase on intracellular concentrations of cAMP by supplementing maturation media with Forskolin and IBMX in order to avoid premature resumption of meiosis. In the Second phase we try to prevent cAMP degradation by using Cilostamide and stimulating oocyte maturation using rhFSH. We were able to set up an *in vitro* biphasic maturation protocol on bovine ovaries from slaughterhouses. The biphasic maturation showed an improvement in quality regarding the control group, in the timing analysis of production and hatching percentages, and these results show that the use of cAMP modulators in oocyte maturation process enhances oocyte competence, which is reflected in an increased productivity and embryo quality. We propose this treatment as an alternative to the standard protocols currently used in IVP of bovine embryos and other species with zoo technical interest.

Keywords: Cattle, embryo, I-SceI, endonuclease, transgenesis, ICSI, Oocyte; maturation, cAMP, IVP

Índice General

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Índice General.....	5
Índice de Tablas y figuras.....	9
Abreviaturas.....	13
Introducción.....	17
Biotecnologías Reproductivas y Mejoramiento Genético Animal.....	17
Importancia de los animales transgénicos.....	17
Métodos para generar animales transgénicos.....	18
Microinyección pronuclear.....	19
Transgénesis mediada por células madre embrionarias.....	20
Transgénesis mediada por virus.....	22
Transferencia nuclear de células somáticas.....	22
Transgénesis mediada por espermatozoides.....	25
Inyección intracitoplasmática de espermatozoides- SMGT.....	28
Uso de enzimas de restricción en transgénesis.....	31
Meganucleasa I-SceI.....	32
“Transgénesis Activa” Uso de la Meganucleasa I-SceI.....	35
Objetivos generales.....	37
Objetivos específicos.....	38
Materiales y Métodos.....	39
Reactivos.....	39
Experimentos preliminares.....	39
Diseño experimental.....	40
Construcciones plasmídicas.....	45
Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos fetales bovinos.....	47
Transfección de fibroblastos fetales bovinos.....	48
Electroforesis alcalina en células individuales.....	49



Citometría de flujo	49
Western blot.....	50
Extracción de ADN genómico.....	51
PCR de ADN Genómico.....	51
Recolección y selección de los ovocitos.....	52
Maduración in vitro en bovinos.....	53
Maduración in vitro en equinos.....	54
Procedimiento de TNCS.....	54
Células donantes para TNCS.....	55
Transferencia nuclear de células somáticas.....	55
Fusión.....	56
Activación química.....	56
Cultivo embrionario.....	56
Evaluación de la expresión de la proteína verde fluorescente.....	56
Procesamiento del semen y capacitación espermática.....	57
Mezcla de digestión de I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo con enzimas de restricción.....	57
Coincubación de espermatozoides con ADN exógeno.....	58
Procedimiento de ICSI.....	58
Activación química de ovocitos post- ICSI.....	59
Sexado de embriones mediante diagnóstico genético preimplantacional con líquido blastocélico.....	60
Análisis estadístico.....	62
Resultados.....	63
Verificación de la funcionalidad in vitro del vector de expresión.....	63
EXPERIMENTO 1: Establecimiento de líneas de células somáticas modificadas genéticamente empleando un sistema mediado por la meganucleasa I-SceI.....	65
Electroforesis alcalina en células individuales (Ensayo Cometa).....	67
Determinación de la tasa de transfección estable.....	68
Determinación de la presencia del transgén al ADN genómico.....	70

EXPERIMENTO 2: Generación de una línea celular bovina que produzca de manera constitutiva la meganucleasa I-SceI..... 71

Obtención de ovocitos 73

Maduración in vitro 73

Activación Partenogenética 74

EXPERIMENTO 3: Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas..... 74

Transferencia nuclear, fusión y activación 74

Desarrollo in vitro y expresión del gen ZsGreen1 en embriones bovinos generados por transferencia nuclear de células somáticas..... 75

EXPERIMENTO 4: Se evaluó la tasa de transgénesis mediada por ICSI en presencia de una enzima de restricción de muy baja frecuencia de corte del ADN (reconoce un sitio de restricción de 18 pb)..... 83

EXPERIMENTO 5: Se evaluó la transgénesis mediada por ICSI cuando se emplea una enzima de restricción de alta frecuencia de escisión del ADN (reconoce un sitio de restricción de 6 pb). 90

Introducción 104

Producción in vitro de embriones 104

Maduración ovocitaria 104

Moduladores de AMPc 107

Marcadores de calidad embrionaria 109

Objetivos específicos 112

Materiales y Métodos..... 113

Maduración in vitro estándar 113

Maduración bifásica empleando moduladores de AMPc 113

Fertilización in vitro..... 114

Determinación del estado de capacitación espermática..... 114

Cultivo embrionario in vitro 115

Análisis de eclosión embrionaria 115

Cuantificación de células embrionarias 115

Criopreservación de embriones	116
Descongelado de los embriones.....	117
Análisis estadístico	117
Resultados.....	118
Análisis de maduración ovocitaria.....	118
Clivaje embrionario	120
Producción embrionaria.....	121
Tasa de eclosión.....	123
Recuento celular en embriones de día 8	125
Criotolerancia embrionaria	127
Discusión	129
Conclusiones.....	138
Perspectivas	140
Bibliografía	141

Índice de Tablas y Figuras

Tabla I. Transgénesis por transferencia nuclear de células somáticas para la producción de animales transgénicos en diferentes especies.....	25
Tabla II. Transgénesis mediada por espermatozoides para la producción de animales transgénicos en diferentes especies.....	27
Tabla III. Transferencia de genes mediada por ICSI-SMGT para la producción de animales modificados genéticamente.....	29
Tabla IV. Maduración in vitro de ovocitos	73
Tabla V. Desarrollo in vitro y expresión del gen ZsGreen1 en embriones bovinos generados por TNCS.....	77
Tabla VI. Desarrollo de embriones bovinos producidos por ICSI con sin asistencia por activación química.	83
Tabla VII. Transgénesis mediada por ICSI con una enzima de restricción de muy baja frecuencia de corte del ADN, la I-SceI.	85
Tabla VIII. Transgénesis mediada por ICSI en equinos empleando una enzima de restricción, la meganucleasa I-SceI.	89
Tabla IX. Transgénesis mediada por ICSI con una enzima de restricción de alta frecuencia de corte del ADN, la BssHII.....	91
Tabla X. Transgénesis mediada por ICI- FIV empleando la meganucleasa I-SceI	92
Tabla XI. Inhibidores de fosfodiesterasas.	109
Figura 1. Principales técnicas usadas para generar animales transgénicos.....	19
Figura 2. Mecanismo general de homing de intrones.	33
Figura 3. Mecanismo de acción de la endonucleasa homing I-SceI	34
Figura 4. Experimento 1. Establecimiento de líneas de células somáticas modificadas genéticamente empleando enzimas de restricción.....	41
Figura 5. Experimento 3. Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas (clonación).	42
Figura 6. Esquema de la estrategia de construcción del vector de expresión I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo.	46

Figura 7. Plásmidos Utilizados en este capítulo.	47
Figura 8. Cultivo primario. Procesamiento de los fetos y generación de líneas de fibroblastos fetales bovinos.....	48
Figura 9. Procesamiento de ovarios bovinos y maduración in vitro de ovocitos...	53
Figura 10. Enucleación del ovocito y transferencia nuclear de células somáticas en especie bovina.	55
Figura 11. Secuencia fotográfica del procedimiento de Inyección intracitoplasmática de espermatozoides ICSI.	59
Figura 12. Sexado de embriones mediante diagnóstico genético preimplantacional con líquido blastocélico.....	61
Figura 13. Análisis de restricción del plásmido recombinante I-SceI-pBSII-SK+ ZsGreen1+Neo.	64
Figura 14. Microfotografías de fibroblastos fetales bovinos.....	64
Figura 15. Plásmido control pCBA.....	65
Figura 16. Expresión temporal de la meganucleasa I-SceI.....	66
Figura 17. Electroforesis alcalina en células individuales.....	67
Figura 18. Ensayo cometa.	68
Figura 19. Líneas de células transgénicas verdes fluorescentes obtenidas luego de 21 días de selección con G418 con morfología tipo- fibroblasto.....	69
Figura 20. Número de colonias de células fluorescentes obtenidas a los 21 días post co-transfección empleando enzimas de restricción.	69
Figura 21. Colonias de Fibroblastos fetales bovinos fluorescentes transgénicos con pérdida de morfología característica.	70
Figura 22. Detección por PCR del casete para la expresión del gen ZsGreen1 a partir del ADN genómico de dos líneas clonales transgénicas derivadas del tratamiento 2.....	71
Figura 23. Número de colonias de células que expresan constitutivamente la meganucleasa.	72
Figura 24. Fibroblastos fetales bovinos obtenidos por transfección empleando el plásmido pNG26i.	72
Figura 25. Electrofusión. La flecha blanca indica un fibroblasto fetal bovino no fusionado luego de la electrofusión, seguida de la activación química.	75



Figura 26. Análisis de clivaje embrionario (FFB control vs FFB transgénicos).	78
Figura 27. Análisis de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto luego de transferencia nuclear de células somáticas.	78
Figura 28. Embriones bovinos transgénicos generados por transferencia nuclear de células somáticas al día 4.	79
Figura 29. Blastocisto bovino generado por transferencia nuclear de células somáticas al día 7.	80
Figura 30. Embriones bovinos generado por TNCS al día 7.	81
Figura 31. Análisis de clivaje embrionario luego de ICSI-SMGT.	84
Figura 32. Embriones bovinos transgénicos producidos por ICSI usando espermatozoides previamente incubados con el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo y la enzima de restricción I-SceI.	86
Figura 33. Puesta a punto de biopsia embrionaria a partir de líquido blastocélico.	87
Figura 34. Embrión equino transgénico generado por ICSI-SMGT.	88
Figura 35. Embriones bovinos transgénicos producidos por ICSI usando espermatozoides previamente incubados con el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo y la enzima de restricción BssHII.	90
Figura 36. Esquema de la interacción ovocito-células del cumulus, junto a los procesos moleculares que ocurren en el interior y exterior del ovocito.	108
Figura 37. Patrones de la técnica de CTC.	115
Figura 38. Esquema del armado de pajueta para criopreservación de embriones.	116
Figura 39. Fotografías de ovocitos madurados in vitro.	119
Figura 40. Análisis de maduración ovocitaria.	120
Figura 41. Análisis de tasas de clivaje embrionario de presuntos cigotos.	121
Figura 42. Análisis de producción embrionaria a los días 7 y 8 de cultivo embrionario.	122
Figura 43. Blastocistos obtenidos por fertilización in vitro de ovocitos madurados empleando el tratamiento bifásico.	123
Figura 44. Blastocistos obtenidos por fertilización in vitro de ovocitos madurados empleando el tratamiento bifásico.	124
Figura 45. Análisis de eclosión embrionaria.	125
Figura 46. Recuento celular.	126

Índice de Tablas y Figuras

Figura 47. Análisis de número de células por embrión.....	127
Figura 48. Análisis de recuperación embrionaria post-criopreservación.....	127



Abreviaturas

%: porcentaje

°C: grado centígrado

µg: microgramo

µL: microlitro

µM: micromolar

µs: microsegundo

6-DMAP: 6-dimetilaminopurina

AC: adenilato ciclasa

ACi: adenilato ciclasa invasiva

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARN: ácido ribonucleico

BLASTn: base de datos de secuencias nucleotídicas (*Basic Local Alingment search tool nucleotide*)

BSA: albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

c.s.p: cantidad suficiente para

CCF: colonias de células fluorescentes

CHX: Cicloheximida

CIL: Cilostamida

CIV: cultivo *in vitro* de embriones

CMV: citomegalovirus

COCs: complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito

CSC: medio de cultivo embrionario (*Continuous Single Culture*)

DMAc: N,Ndimetilacetamida

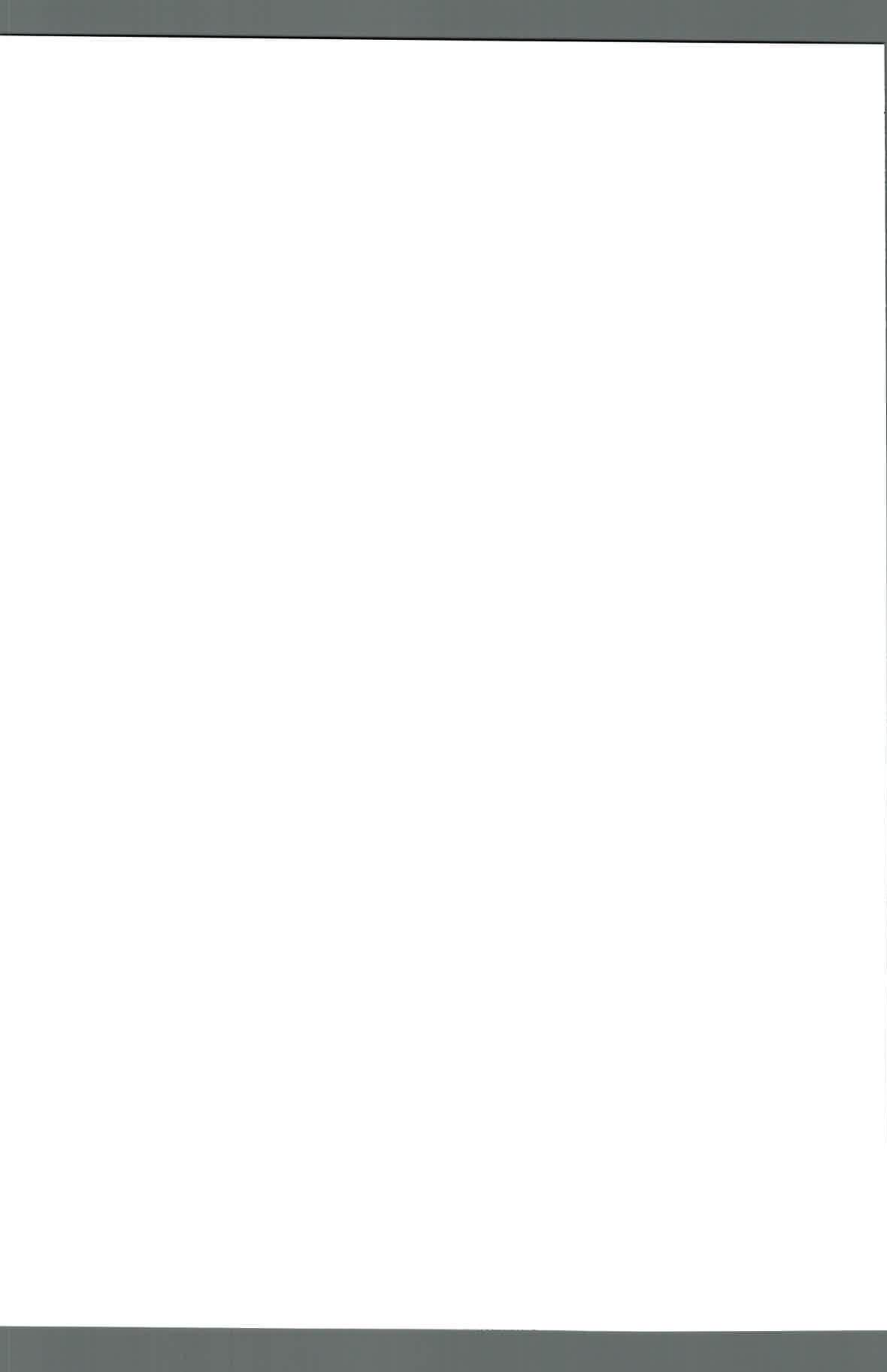
DMSO: dimetilsulfóxido

DNA-BPs: Proteínas específicas de unión al ADN (del inglés, *DNA binding proteins*)

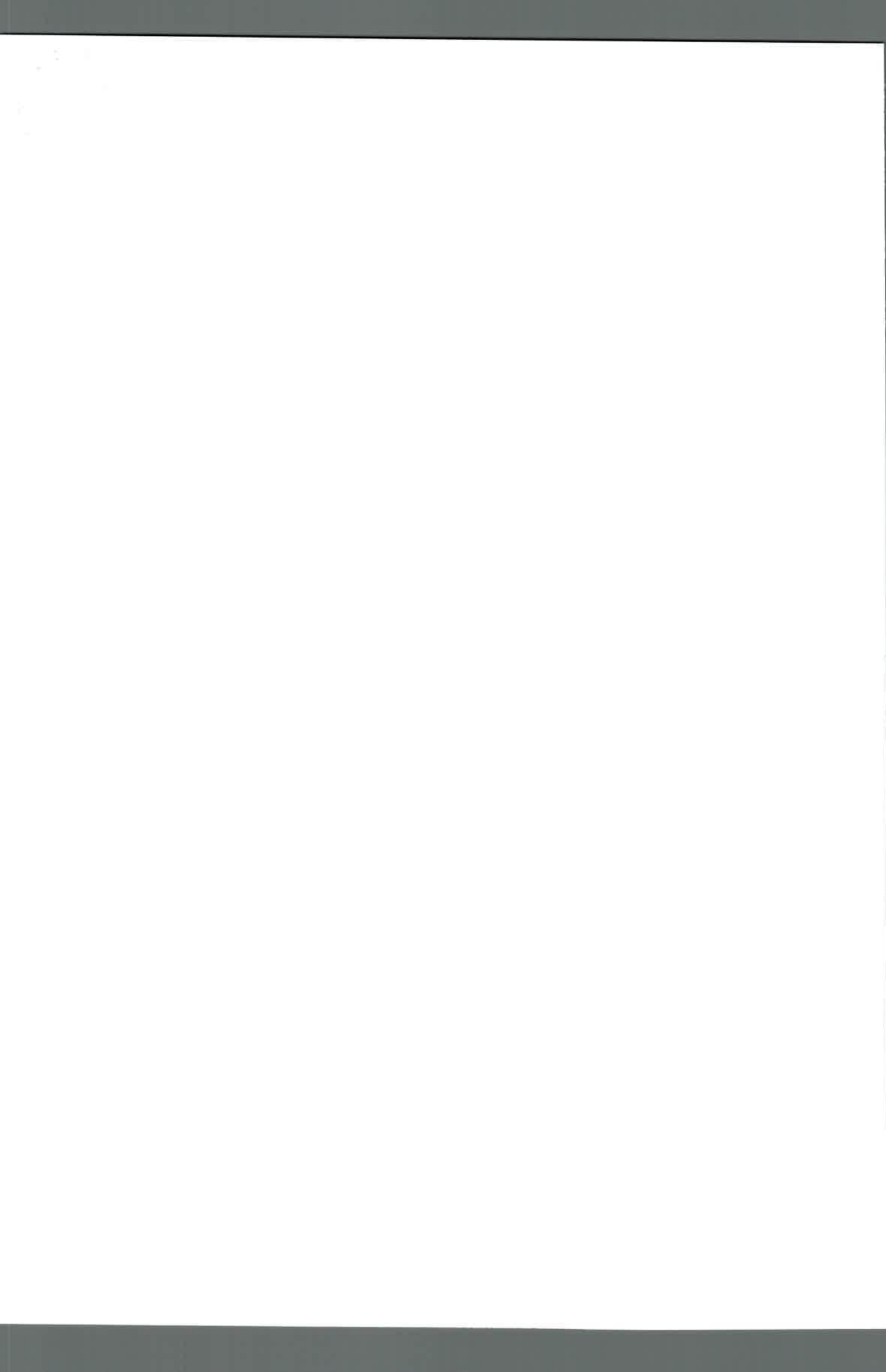
dNTP: desoxinucleótidos

DO: densidad óptica

DPBS: tampón fosfato salino de Dulbecco modificado (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*)



- DSBs:** cortes de ADN doble cadena (*Double Strand Breaks*)
- E. coli:** *Escherichia coli*
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EGFP:** proteína verde fluorescente aumentada (*Enhanced Green Fluorescent*)
- ER:** enzimas de restricción
- FFB:** fibroblastos fetales bovinos
- FIV:** fertilización *in vitro*
- FPM:** Factor promotor de la Meiosis
- g:** gramo
- h:** horas
- HCG:** gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Godanotropin*)
- HeLa:** células de cáncer del epitelio cervical humano
- HV:** alto voltaje (*High voltage*)
- IA:** inseminación artificial
- IBMX:** 3-Isobutyl-1-methylxanthine
- ICSI:** inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmic Sperm Injection*)
- Io:** ionomicina
- IP:** yoduro de propidio
- I-SceI:** meganucleasa codificada por el intrón I del ARNr 21s de *Saccharomyces cerevisiae*.
- L:** Litro
- LB:** Luria Bertani
- LH:** hormona luteinizante
- mg:** miligramo
- MII:** metafase II
- min:** minuto
- MIV:** maduración *in vitro*
- mL:** mililitro
- mM:** milimolar
- ms:** milisegundo
- Nº cels/blastocisto:** número medio de células por blastocisto



- NCBI:** del inglés, *national center of biotechnology information*
- ng:** nanogramos
- ON:** toda la noche (*Over Night*)
- OPU:** punción folicular guiada por ultrasonografía (*ovum pick up*)
- P:** pasaje
- Pb:** pares de bases
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- PDE:** fosfodiesterasa
- PEI :** polietilenimina
- PIV:** producción *in vitro*
- PVA:** alcohol polivinílico
- PVP:** polivinilpirrolidona
- RH:** recombinación homóloga
- rhFSH:** hormona folículo estimulante recombinante humana
- rpm:** revoluciones por minuto
- SDS:** dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*)
- SF:** solución fisiológica
- SFB:** suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*)
- SFM:** medio de fecundación porcino (*Swine Fertilisation Medium*)
- SMC:** sitio múltiple de clonado
- SMGT:** transgénesis mediada por espermatozoides (*Sperm Mediated Gene*
- TAE:** Tris Acetato EDTA
- TALP:** medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrodes Albumin*
- TBE:** tris-borate-EDTA
- TMGT:** Transgénesis mediadas por la testis (*testis mediated gene transfer*)
- TNCS:** transferencia nuclear de células somáticas (*Somatic cell nuclear transfer*)
- UI:** unidades internacionales
- UV:** ultravioleta
- V:** voltaje
- Vf:** volumen Final
- ZFNs:** Nucleasas Dedos de Zinc (*zinc finger nucleases*)
- ZP:** zona pelúcida



ZsGreen1: proteína verde fluorescente silvestre de *Zoanthus* sp (*Zoanthus* sp. *green fluorescent protein*)



Capítulo I

Transgénesis en Bovinos Mediada por TNCS e ICSI Empleando Enzimas de Restricción

- Parte de los resultados preliminares de este capítulo fueron seleccionados para presentación oral en la XII Jornada de la Sociedad Argentina de Biología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 2010.
- Los resultados obtenidos en este capítulo fueron seleccionados para presentación modalidad póster en la conferencia anual de la International Embryo Transfer Society (IETS). Hannover, Alemania, 2013.



Capítulo I

INTRODUCCIÓN



Introducción

Biotecnologías Reproductivas y Mejoramiento Genético Animal

Originalmente el término “transgénesis animal” se acuñó para indicar la introducción deliberada de nueva información genética en la línea germinal. Sin embargo, con los recientes avances en las áreas de la genética molecular y técnicas de ADN recombinante, hoy es posible, no solamente incorporar nuevo material genético, sino también suprimir (*knock-out*) o reemplazar (*knock-in*) porciones específicas del genoma de un organismo. La ingeniería genética permite generar cambios que persistan en las generaciones siguientes, transfiriendo a la descendencia los caracteres deseados, los cuales serían muy difíciles de lograr con los métodos de mejoramiento tradicional mediante el cruzamiento selectivo de individuos.

Un animal transgénico, es un animal en el que se ha producido una modificación deliberada en su genoma, en contraste con una mutación espontánea. Esa modificación debe ser transmitida luego, a través de la línea germinal, de modo que todas las células, incluidas las células germinales del animal, posean el mismo material genético modificado.

Importancia de los animales transgénicos

La biotecnología transgénica promete ocupar un lugar central en diferentes aspectos relacionados a la salud humana y la producción animal. La producción de animales modificados genéticamente ha despertado gran interés, no solo desde el punto de vista científico sino también productivo (Baldassarre y col., 2002; Wang y col., 2002; Ivics & Izsvak., 2004). En el área agropecuaria se prevé la introducción de animales con modificaciones genéticas que resulten en una mejora en la performance productiva con características más eficientes y competitivas, tales como mayor tasa de crecimiento en animales para carne; carnes más saludables, por ejemplo con mejores perfiles de ácidos grasos; mayor producción de leche o cantidad de lana; y resistentes a enfermedades tal como la encefalopatía espongiiforme bovina entre otras (Cyranoski y col., 2003; Donovan y col., 2005; Richt y col., 2007).



La utilidad de los animales genéticamente modificados no se limita a su uso como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes con interés farmacológico destinadas al tratamiento de un sinnúmero de padecimientos (Schnieke y col., 1997; McWhir, 2002); y/o que expresan proteínas específicas en diferentes fluidos corporales (Cyranoski, 2003; Mutto y col., 2009). Los ratones modificados genéticamente sirven como poderosas herramientas para investigar la patogenia de numerosas enfermedades humanas; sin embargo son de escaso valor en estudios preclínicos, dado que difieren de los humanos en tamaño, fisiología y anatomía. Es por ello que se intenta desarrollar animales de granja con células y tejidos “humanizados” como fuente de material biológico para xenotransplante humano (MacKenzie y col., 2003; Eksler y col., 2009); animales transgénicos como modelos de estudio de patologías humanas en los que se pueda por ejemplo, probar tratamientos con nuevas drogas en fases preclínicas, practicar cirugías y hasta inclusive ensayar nuevo equipamiento médico (Fan & Watanabe, 2003; Norgren, 2004; Flisikowska y col., 2012). La expresión ectópica de transgénos (con ganancia de función) y la disrupción de genes endógenos (con pérdida de función) en animales transgénicos también han sido de gran valor para dilucidar los mecanismos responsables de la regulación génica (Grabher & Wittbrodt, 2004); estudiar la expresión génica, y regulación de promotores y secuencias codificantes (Haruyama y col., 2009). Sin embargo todavía existen un sinnúmero de barreras biológicas, metodológicas y éticas que tienen que ser superadas para que estos emprendimientos biotecnológicos puedan dar respuesta a las expectativas generadas tanto en el ámbito científico-académico como en la sociedad en su conjunto.

Métodos para generar animales transgénicos

Si bien la posibilidad de producir animales transgénicos mediante la introducción de ADN exógeno existe desde hace muchos años, las técnicas para inducir modificaciones génicas intencionales en especies mayores de interés agropecuario, se encuentran rezagadas si se compara con los avances significativos que se han producido en el área de la transgénesis de roedores de laboratorio, especialmente el ratón. La figura 1 esquematiza los métodos disponibles para generar animales transgénicos en la actualidad. Se pueden caracterizar en cinco técnicas principales.



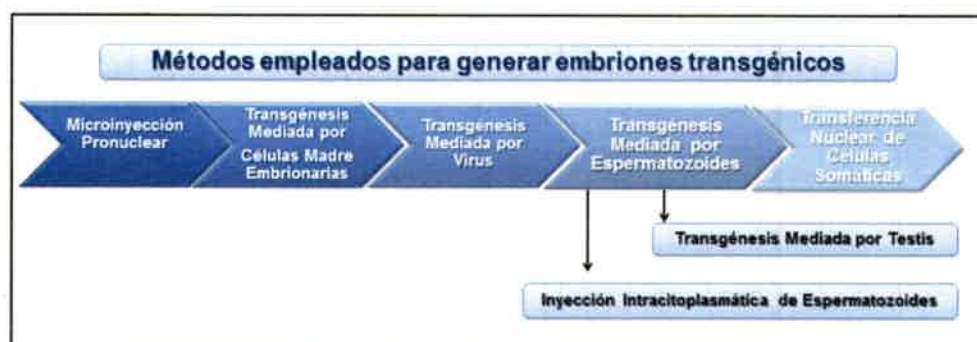


Figura 1. Principales técnicas usadas para generar animales transgénicos.

Microinyección pronuclear

La microinyección pronuclear fue la primera técnica utilizada para generar ratones transgénicos (Gordon y col., 1980). Este procedimiento consiste en el uso de micromanipulación para inyectar un pequeño volumen de una solución ADN foráneo conteniendo el gen de interés, directamente en el pronúcleo masculino de un cigoto. La transferencia de los embriones inyectados a una madre sustituta daría eventualmente origen a embriones portadores del transgén. La adecuada visualización del pronúcleo masculino presenta la primera clara limitación que ha obstaculizado la difusión de esta metodología para generar animales mayores transgénicos. Sin embargo se ha logrado generar aunque con baja eficiencia cerdos transgénicos (Hammer y col., 1985), cabras (Ebert y col., 1991), ovejas (Murray y col., 1989), y vacas (Krimpenfort y col., 1991; Eyestone., 1999). El éxito de la microinyección pronuclear respecto de la integración del transgén varía entre el 3% para ratones, ratas y conejos a sólo el 1% para el ganado bovino, los cerdos y las ovejas (Wall y col., 1996).

El uso de la microinyección pronuclear para crear animales transgénicos puede conducir a una gran variabilidad en la expresión del transgén. Sumado a su baja eficiencia, este método sólo permite la integración al azar del ADN exógeno, en lugar de dirigir su ingreso a sitios específicos (Auerbach, 2004; Clark y col., 1994). El uso de los métodos basados en la intercalación al azar del transgén se limita a aquellos casos en que se persigue la incorporación de nueva información genética, por ejemplo incorporar secuencias que codifican para la expresión de una proteína heteróloga (Schnieke y col., 1997).



En el caso de que la integración del transgén ocurra posteriormente a la primera replicación del ADN genómico se generan embriones mosaico, en los cuales no todas células del animal contienen el transgén de interés. Para la creación de animales transgénicos mediante microinyección pronuclear es necesario obtener descendencia de la quimera resultante (Wolf y col., 2000; Houdebine., 2002). A través del cruzamiento selectivo de los animales mosaico en especies de gestaciones largas como los bovinos, el tiempo para la transmisión a la línea germinal de los caracteres deseados es elevado en razón del prominente intervalo generacional, lo cual, sumado al elevado costo que implica tener un rodeo grande de receptoras sincronizadas (Wall y col., 1996; Wells y col., 1999), puede llegar a ser una gran desventaja del uso de microinyección pronuclear en especies domésticas.

Transgénesis mediada por células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESCs, del inglés *Embryonic Stem Cells*) son utilizadas extensamente para generar ratones transgénicos. Estas células, aisladas del macizo celular interno de los blastocistos, en presencia de inhibidores de la diferenciación adecuados, tienen el potencial para dividirse indefinidamente en cultivo (Evans y col., 1981; Martín., 1981; Thomas & Capecchi., 1987), pudiendo originar tanto células somáticas como a germinales presentes en un organismo adulto. La capacidad de multiplicación indefinida *in vitro* representa una cualidad importante a la hora de utilizarlas para introducir modificaciones en su genoma. Cuando las ESCs modificadas genéticamente son seleccionadas e introducidas en el interior de un embrión preimplantacional en crecimiento, las células se multiplican y contribuyen a la formación de los diferentes tejidos del animal. La transmisión del transgén a través de la línea germinal de éstos animales quiméricos se utiliza para generar animales completamente transgénicos, a través de estrategias de cruzamiento convencional. Sin embargo, una gran ventaja de usar ESCs respecto de la microinyección pronuclear, es la posibilidad de seleccionar la integración del transgén mediante el uso de marcadores de selección en las líneas celulares empleadas. El uso de ESCs también permite la modificación sitio dirigida del ADN genómico dando lugar a la creación de *knock-outs* genéticos y otras modificaciones precisas del genoma mediante el fenómeno conocido como recombinación homóloga (RH). Este último mecanismo puede ocurrir solamente



si el transgén ha sido diseñado de tal modo que contenga secuencias homólogas a las del *locus* que se pretende modificar. A pesar de la multiplicidad de usos de las metodologías basadas en la RH, la bajísima frecuencia con que ocurre dicho proceso ($1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-7}$, Denning & Priddle., 2003), hacían imprescindible utilizar estrategias de selección para identificar las líneas celulares que presentan la modificación deseada (Hasty y col., 1999). En consecuencia, la baja frecuencia con la que se produce la integración genómica del transgén en sitios específicos, representa un obstáculo considerable para la aplicación de estas metodologías para la producción de animales mayores genéticamente modificados. Sin embargo, desde hace varios años se están desarrollando herramientas genéticas que permiten la manipulación del genoma para hacer más eficientes los eventos de mutación dirigida o transgénesis: endonucleasas *homing* o meganucleasas, nucleasas dedos de Zinc (ZFN, del inglés *Zinc Finger Nucleases*) (Wood-Aj y col., 2011), las TALE asociadas a nucleasas *folkl* (TALEN, del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) (Wood-aj y col., 2011; Zhang y col., 2011) y las endonucleasas de ADN Cas9 dependiente de ARN del sistema CRISPR (CRISPR, del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) (Bhaya y col., 2011). Estas nucleasas presentan la ventaja de no necesitar selección con antibióticos, lo cual lo cual es de gran importancia pensando en la futura incorporación de animales transgénicos en la cadena alimenticia humana.

En la actualidad se conocen al menos seis líneas de ESCs con pluripotencia demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* en la especie bovina (Paris & Stout., 2010). Sin embargo, todas estas líneas varían entre sí en morfología y en la expresión de marcadores normalmente asociados a estados de indiferenciación y pluripotencia (Stice y col., 1996; Cibelli y col., 1998; Kitiyanant y col., 2000; Mitalipova y col., 2001, Saito y col., 2003, Wang y col., 2005). Se ha trabajado bastante para aislar y cultivar ESCs bovinas empleando como estrategia el co-cultivo con diferentes tipos de células denominadas alimentadoras, que aportan factores de crecimiento necesarios para que las ESCs crezcan adecuadamente (Cibelli y col., 1998, Mitalipova y col., 2001). La dificultad de generar ESCs bovinas hace que la generación de quimeras no sea actualmente una técnica viable en esta especie.



Al igual que en la microinyección pronuclear, con el uso de ESCs, las quimeras generadas deben ser sometidas a cruzamientos selectivos, con el fin de generar embriones capaces de transferir a la descendencia los caracteres deseados.

Transgénesis mediada por virus

Si bien cada método tiene sus ventajas y desventajas, los vectores virales están ganando aceptación por su alta eficiencia para introducir moléculas de ADN al interior de la célula. En los vectores, segmentos del genoma viral salvaje han sido eliminados para permitir el empaquetamiento del material genético que se pretende introducir y al mismo tiempo suprimir los mecanismos naturales de replicación viral que causarían daño celular.

Cuando el objetivo es la modificación permanente de las líneas celulares, es necesario el uso de vectores virales que posean la capacidad de integrarse al genoma, tal el caso de los vectores derivados de retrovirus y lentivirus. La capacidad que tienen los vectores derivados de retrovirus para integrarse aleatoriamente en el genoma de la célula huésped ha sido explotada para introducir el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) en líneas celulares porcinas, las cuales se utilizaron seguidamente para producir embriones (Uhm y col., 2000) y cerdos transgénicos mediante TNCS (Park y col., 2001; Lai y col., 2002). El lentivirus, un retrovirus complejo, representa una alternativa a los vectores retrovirales oncogénicos debido a su habilidad para infectar una amplia gama de tipos celulares, inclusive células que no están dividiéndose activamente (quiescentes), aventajando de esta manera a los vectores gamma-retrovirales. Mediante esta técnica se ha obtenido 60% de eficiencia en ratones (Ikawa y col., 2003), 70% en cerdos (Hofmann y col., 2003) y 99% de eficiencia en bovinos transgénicos clonados que expresan la proteína heteróloga GFP a partir de fibroblastos infectados con lentivirus que portaban el transgén (Hoffman y col., 2004). Dichas eficiencias son, hasta la fecha, las más altas para transgénesis en animales de granja.

Transferencia nuclear de células somáticas

La técnica más utilizada actualmente en la generación de animales domésticos transgénicos es la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) o clonación, en la



cual el animal resultante puede transferir el gen introducido a su descendencia, que será también transgénica (Wolf y col., 2000; Houdebine, 2002). Esta biotecnología supera muchas de las limitaciones de los otros métodos permitiendo, en forma asexual, la producción de un organismo genéticamente idéntico al material nuclear con el que se generó (Bosch y col., 2004). Cuando las células en cultivo son transfectadas, es posible la caracterización de la modificación génica antes de proceder a la producción del animal transgénico introduciendo un importante punto de control (Bordignon y col., 2003). De esta manera, es posible identificar aquellas líneas celulares que poseen la modificación genética deseada, antes de la transferencia nuclear, aumentando así, la eficiencia de la técnica.

La aplicación de la clonación tradicional en el ámbito de la producción animal traería aparejadas ventajas productivas y económicas. Permite una rápida propagación de genotipos probados en el sector ganadero donde se transfiere el 100% de una genética conocida, a través de la disminución del intervalo de progreso genético (Mutto y col., 2009; Miragaya y col., 2010). Además, asegura la transmisión del mérito genético ya sea para características productivas o reproductivas, como fertilidad, salud y vida útil (Panarace y col., 2007); permite recuperar material genético de animales que por alguna razón quedan fuera del círculo reproductivo. Por ejemplo, animales que padecen enfermedades terminales o infecto-contagiosas, animales en edad avanzada, con lesiones anatómicas, o que han sido castrados y ya no pueden generar descendencia por los métodos reproductivos naturales. En cuanto a animales de razas nativas en extinción que han sido desplazados por otras razas de mayor importancia comercial, esta técnica permite la conservación genética de las mismas. Estos animales contienen una genética valiosa que les confiere características que los hacen más adaptables al ambiente, como resistencia al calor y a determinadas enfermedades. La tabla I muestra la producción de animales transgénicos en diferentes especies mediante transferencia nuclear de células somáticas.

El primer paso en la producción de animales transgénicos mediante TNCS consiste en incorporar el material genético dentro de la célula en cultivo, más específicamente dentro del núcleo, para permitir que dicho ADN se intercale en el genoma celular. Las células del donante pueden proceder de una amplia variedad de tipos celulares que van desde blastómeras embrionarias hasta células adultas. Para que



el ADN foráneo ingrese al interior de células en cultivo se pueden utilizar métodos físicos (como la electroporación), químicos (como el uso de sustancias policationicas; Mutto y col., 2009; Ortega y col., 2011, 2012; Forcato y col., 2012) o vectores de origen viral (Clark y col., 2000; Scilingo y col., 2011). Una vez que ha ingresado el transgén al interior de la célula, su integración al genoma puede ocurrir al azar o en un locus específico a través de RH (Thomas & Capecchi., 1987). Es común observar una disminución o abolición de la expresión de la proteína transgénica (fenómeno conocido como silenciamiento), originada en modificaciones epigenéticas de las secuencias de ADN incorporadas.

Una de las principales ventajas de éste método, radica en que el sexo del animal puede ser predeterminado por la elección del material del donante. Al usar cultivos celulares para propagar las células donantes, se puede dar lugar a un gran número de células transgénicas que pueden alternativamente ser congeladas y almacenadas durante largos períodos de tiempo. El uso adecuado de TNCS también asegura que la mayor parte de los animales producidos sean transgénicos, por lo que cada célula de un animal clonado tendrá el transgén, ahorrando así el tiempo y costo, asociado al mantenimiento de las hembras receptoras.

En nuestro laboratorio se desarrolló un vector policistrónico capaz de introducir los genes humanos de lactoferrina y lisozima en un solo evento de inserción en fibroblastos bovinos. Una vez obtenido el mismo y comprobada su eficiencia de expresión *in vitro*, los fibroblastos transfectados fueron utilizados para generar embriones *in vitro* mediante clonación por TNCS. Una vez producidos estos embriones se transfirieron a hembras receptoras, obteniéndose nueve meses después una hembra portadora de ambos genes. Un año más tarde, y luego de una inducción artificial de la lactancia, se logró comprobar en su leche la presencia lisozima y lactoferrina humanas por técnicas clásicas como *Western blot* y ELISA. Este resultado constituye nuestro principal antecedente en el tema y representa un avance importante en la tecnología de modificación genética de animales, ya que constituye el primer informe mundial sobre la producción de un bovino bitransgénico, dado que expresa las dos proteínas humanas (Mutto y col., 2009).



Tabla I. Transgénesis por transferencia nuclear de células somáticas para la producción de animales transgénicos en diferentes especies

Especie	Grupo de investigación (año)
Ratón	Kishigami y col., (2009)
Ovinos	Schnieke y col., (1997)
Caprinos	Baldassarre y col., (2003) ; Bordignon y col., 2003
Porcinos	Lai y col., (2002); Nagashima y col., (2003)
Bovinos	Mutto y col., (2009); Niemann & Kies., (2003)
Hurones	Yan y col., (2009)

Transgénesis mediada por espermatozoides

Los espermatozoides de mamífero fueron considerados durante mucho tiempo como células metabólicamente inertes, asumiendo que su única función es la de actuar como vector de su propio genoma durante la fertilización. En el año 1971 se demostró la capacidad intrínseca de los espermatozoides de mamífero para unirse a moléculas de ADN exógeno mediante una simple coincubación *in vitro*, y vehicular dicho ADN al interior de embriones durante el proceso de fertilización (Brackett y col., 1971).

Basándose en esta habilidad de unirse al ADN surgió la transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT, del inglés *sperm mediated gene transfer*), como un nuevo método para la producción de animales transgénicos (Lavitrano y col., 1989). En su estudio se logró obtener ratones transgénicos producidos por fertilización *in vitro* de ovocitos empleando espermatozoides epididimarios previamente incubados durante 15 minutos con un plásmido en su conformación lineal o circular. Secuencias complementarias del plásmido internalizado por los espermatozoides fueron identificadas en aproximadamente el 30% de la progenie F1 mediante *Southern blot*. Al igual que para la microinyección pronuclear, por éste método, no se pueden hacer

modificaciones sitio específicas debido a que el transgén se integra al azar en el genoma.

Respecto de otros métodos disponibles para generar animales transgénicos tales como la microinyección pronuclear, o la clonación empleando como donantes células transgénicas, la SMGT prometía ser un método con alta eficiencia, al permitir generar un alto número de embriones transgénicos en un solo paso; ofrecía ser una técnica relativamente simple basada en la manipulación de gametas en lugar de embriones, y presentar bajo costo, al no precisar ningún tipo de equipamiento especial, por lo que se puede realizar en mamíferos en condiciones de campo, por ejemplo en protocolos de inseminación artificial. Sin embargo, aunque atractiva por su simplicidad, esta técnica ha sido muy cuestionada por su poca reproducibilidad (Brinster y col., 1989; Birnstiel & Busslinger 1989; Wall 1999). Varios estudios posteriores sugieren que la inconsistencia entre los resultados podría atribuirse a la activación de mecanismos de defensa en el espermatozoide y el plasma seminal, resultando en la degradación del ADN exógeno (Sato y col., 2003; Kang y col., 2008; Lanes y col., 2009).

En el protocolo original de SMGT, los espermatozoides epididimarios se incuban con el ADN que contiene el gen de interés seguido por la fertilización *in vitro* o la inseminación *in vivo* (Lavitrano y col., 1989). A pesar de que la incorporación del ADN heterólogo ocurre espontáneamente, se ha demostrado que la eficiencia global de la técnica se ve aumentada cuando en lugar de espermatozoides epididimarios se emplean espermatozoides del eyaculado. Esto representa una ventaja dado que en la actualidad existen diversos protocolos para la criopreservación de espermatozoides epididimarios o eyaculados. Al trabajar con eyaculado, los animales donantes pueden ser aprovechados durante toda su vida reproductiva.

Para la generación de animales transgénicos mediante SMGT es necesario optimizar el protocolo en las diferentes especies, seleccionar un animal donante con buenos parámetros de calidad seminal, y establecer el tiempo y concentración de ADN óptimos en la coincubación *in vitro*. La eficiencia en la unión ADN-espermatozoide debe ser máxima, pero sin afectar los parámetros fisiológicos normales como la motilidad progresiva que resultaría en última instancia en una baja tasa de producción embrionaria luego de la fertilización *in vitro* o inseminación artificial (Lavitrano y col.,



2003). La tabla II muestra el uso de transgénesis mediada por espermatozoides para la producción de animales transgénicos en diferentes especies.

Tabla II. Transgénesis mediada por espermatozoides para la producción de animales transgénicos en diferentes especies

Especie	Grupo de investigación (año)
Ratón	Lavitrano y col., (1989); Hochi y col., (1990) Bachiller y col., (1991); Maione y col., (1998); Sciamanna y col., (2000); Sato y col., (2002)
Conejo	Brackett y col., (1971); Kuznetsov & Kuznetsov (1995); Wang y col., (2001)
Porcinos	Sperandio y col., (1996); Gandolfi y col., (1998); Lavitrano y col., (2002); Nagashima y col., (2003)
Pollo	Fainsold y col., (1990); Nakanishi y col., (1993) Yang y col., (2004)
Rana (<i>Xenopus Laevis</i>)	Kroll & Amaya (1996); Jonak (2000)
Bovinos	Pérez y col., (1991); Sperandio y col., (1996); Rieth y col., (2000)
Peces	Patil y col., (1996) Sin y col., (2000); Venugopal y col., (2004)
Invertebrados	Tsai y col., (1997)

En base a la morfología y fisiología singular de los espermatozoides, la simple incubación de los mismos con el ADN exógeno no es suficiente para producir la captación del transgén. El ADN exógeno se une selectivamente al segmento postacrosomal del espermatozoide, específicamente a su membrana plasmática a través de proteínas específicas de unión al ADN, (DNA-BPs, del inglés *DNA binding*



proteins). Del total de ADN unido al espermatozoide, 15-20% es internalizado por un mecanismo mediado por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II y por moléculas CD4 (Wu y col., 1990; Lavitrano y col., 1997; Bosch y col., 2004).

En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias con el fin de aumentar la cantidad de ADN incorporada por las células espermáticas que van desde un paso rápido de congelado-descongelado, la electropermeabilización por electroporación (Gagne y col., 1991, Horan y col., 1992), la alteración de las membranas de los espermatozoides mediante el tratamiento con detergentes no polares tales como Tritón X-100, Tween etc. (Perry y col., 1999), el uso de agentes químicos de transfección como liposomas (Hoelker y col., 2007), formación de complejos ADN/criopreservantes empleando dimetilsulfóxido (DMSO), o N,Ndimetilacetamida (DMAc) (Shen y col., 2006, Li y col., 2006, Collares y col., 2011). También se han desarrollado anticuerpos monoclonales que sirven como nexo de unión entre los espermatozoides y el ADN exógeno (Chang y col., 2002); y hasta se ha ensayado el uso de nanopartículas, dando lugar a una nueva era denominada nanoSMGT basada en la magnetofección (Kim y col., 2009) y la nanotransfección empleando nanopolímeros (Campos y col., 2011).

Si bien la SMGT permite el uso de espermatozoides como vehículos no invasivos para transferir ADN foráneo directamente por fertilización *in vitro* o *in vivo*, a lo largo de los años se han generado variaciones de la técnica convencional. Así surgió la transgénesis mediada por testículo TMGT (del inglés, *testis mediated gene transfer*), basada en la microinyección directa del transgén al testículo del macho. Luego los machos que han incorporado eficientemente el transgén se aparean con hembras sincronizadas dando lugar a la progenie transgénica (Celebi y col., 2003; Niu & Liang, 2008).

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides- SMGT

Una variante a la transgénesis mediada por espermatozoides convencional, es la ICSI-SMGT, basado en la inyección mecánica directa del espermatozoide previamente incubado con el ADN foráneo, en el citoplasma del ovocito maduro MII, durante una adaptación de la técnica conocida como Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI, del inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*) (Perry y col.,

1999; Lai y col., 2001; Moreira y col., 2007). Mediante esta técnica se saltean las barreras naturales y fundamentales de la fecundación, como son la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito y la penetración a través de ésta y de la membrana plasmática (Ortega & Bosch., 2012). En la tabla III, se resume la transferencia de genes mediada por ICSI-SMGT establecida con éxito para la producción de animales modificados genéticamente, con eficiencia variable en diferentes especies:

Tabla III. Transferencia de genes mediada por ICSI-SMGT para la producción de animales modificados genéticamente.

Especie	Grupo de investigación (año)
Ratón	Perry y col., (1999); Suganuma y col., (2005); Yamauchi y col., (2007), Moreira y col., (2007)
Porcinos	Lai y col., (2001); Kurome y col., (2006, 2007); García Vázquez y col., (2010)
Ovinos	Pereyra-Bonnet y col., (2011)
Bovinos	Bevacqua y col., (2013)
Primates	Chan y col., (2000)

Algunas de las ventajas de la ICSI-SMGT se basan en la capacidad de transferir ADN de gran tamaño, en mayor concentración y con una mayor eficiencia que la microinyección pronuclear.

La aplicación de la técnica de ICSI en las especies domésticas tales como equinos, bovinos y porcinos, no ha avanzado en la misma medida que para otros mamíferos y está siendo el foco de atención de los programas de investigación de numerosos laboratorios.

Durante la última etapa de la maduración del esperma de mamífero, el núcleo del espermatozoide se condensa a través del reemplazo de histonas por protaminas y se estabiliza por la formación de numerosos enlaces disulfuro entre éstas protaminas

(Calvin & Bedford, 1971; Marushige & Marushige, 1975; Tavalae y col., 2008). Esta condensación tiene grandes consecuencias, tales como la protección del núcleo del espermatozoide contra daños mecánicos y químicos, otorgando hidrodinámica a las cabezas de los espermatozoides, preservando los genes impresos, y la regulación de la expresión génica durante la espermiogénesis (Braun, 2001; Kuretake y col., 1996; Martins y col., 2004; Sotolongo y col., 2003).

Durante la fertilización, el proceso de condensación nuclear espermática es revertido. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en seres humanos y en ratones, el proceso no se completa en ganado porcino y bovino cuando las críticas vías de señalización originadas por la interacción espermatozoide-ovocito se evitan debido al procedimiento de ICSI (Catt & Rhodes, 1995; Perreault y col., 1988.; Suttner y col., 2000; Malcuit y col., 2006).

El ovocito bovino maduro se encuentra detenido en metafase II (MII) de la meiosis y su activación se produce en la fecundación, dado que la penetración del espermatozoide promueve múltiples y periódicas oscilaciones del calcio libre intracelular (Miyazaki y col., 1993). El calcio liberado del retículo endoplasmático liso, dispara cascadas de señales inhibiendo la actividad de los factores citostáticos celulares, los cuales actúan bajando los niveles de actividad de los factores promotores de la maduración (MPF). Estas oscilaciones transitorias de calcio se propagan a lo largo de todo el ovocito fertilizado en forma de ondas provocando tanto la exocitosis de gránulos corticales como el escape del arresto en meiosis MII (Kupker y col., 1998).

Se conocen varios compuestos químicos que pueden inducir un aumento del calcio, iniciando así la activación ovocitaria. Algunos tratamientos de activación artificial, tales como el cloruro de estroncio pueden promover el aumento de la concentración de calcio intracelular libre por la liberación de calcio de las reservas citoplasmáticas (Cuthbertson y col., 1981), otros, tales como el estímulo eléctrico y el uso de ionóforos de calcio promueven el influjo de calcio desde el medio extracelular, y tratamientos con etanol y ionomicina provocan ambos efectos (Loi y col., 1998). Comúnmente estos tratamientos se combinan con inhibidores de la síntesis de proteínas tales como Cicloheximida (CHX) que impide la síntesis de ciclina, y con inhibidores de la fosforilación, como la 6 – dimetilaminopurina (6-DAMP); (Liu y Yang, 1999), que inactiva al factor promotor de la meiosis (MPF). La principal desventaja del uso de

inhibidores de la proteína quinasa o de inhibidores de la síntesis de proteínas, es que estas drogas no inhiben específicamente la actividad de una quinasa en particular o la síntesis de proteínas específicas que controlan la progresión del ciclo celular.

Uso de enzimas de restricción en transgénesis

Las nuevas herramientas genéticas; endonucleasas *homing* o meganucleasas, ZFN, TALENS o CRISPR /Cas (Wood-aj y col., 2011; Zhang y col., 2011; Bhaya y col., 2011), permiten la manipulación del genoma para hacer más eficientes los eventos de mutación dirigida o transgénesis. Todas ellas tienen en común el poseer un dominio de reconocimiento al ADN y otro dominio nucleasa con capacidad de generar un corte en la doble hebra del ADN (DSB, del inglés *Double Strand Break*).

La capacidad de las enzimas de restricción para incrementar la eficiencia de integración genómica de secuencias de ADN heterólogo se conoce desde hace bastante tiempo (Schiestl y col., 1991). La transgénesis mediada por enzimas de restricción se ha utilizado en hongos, protozoos, anfibios y mamíferos (Armstrong y col., 1999; Seo y col., 2000). En un primer estudio, la tasa de crías transgénicas aumentó cuando los cigotos de ratón se coinyectaron con el transgén acompañado por enzimas de restricción (Jacquier & Dujon., 1985). Estos resultados promisorios indicarían que la transgénesis mediada por enzimas de restricción aventaja en términos de la eficiencia de integración del transgén a la microinyección pronuclear convencional.

Se especula que las enzimas de restricción podrían incrementar la eficiencia transgénica actuando de tres modos diferentes:

- 1) Manteniendo los extremos del transgén libres y por lo tanto disponibles para interactuar con el ADN genómico.
- 2) Induciendo rupturas del ADN donde el transgén pueda integrarse.
- 3) Estimulando los mecanismos naturales de reparación del ADN nuclear, lo que facilitaría la intercalación del transgén (Wall, 1996).

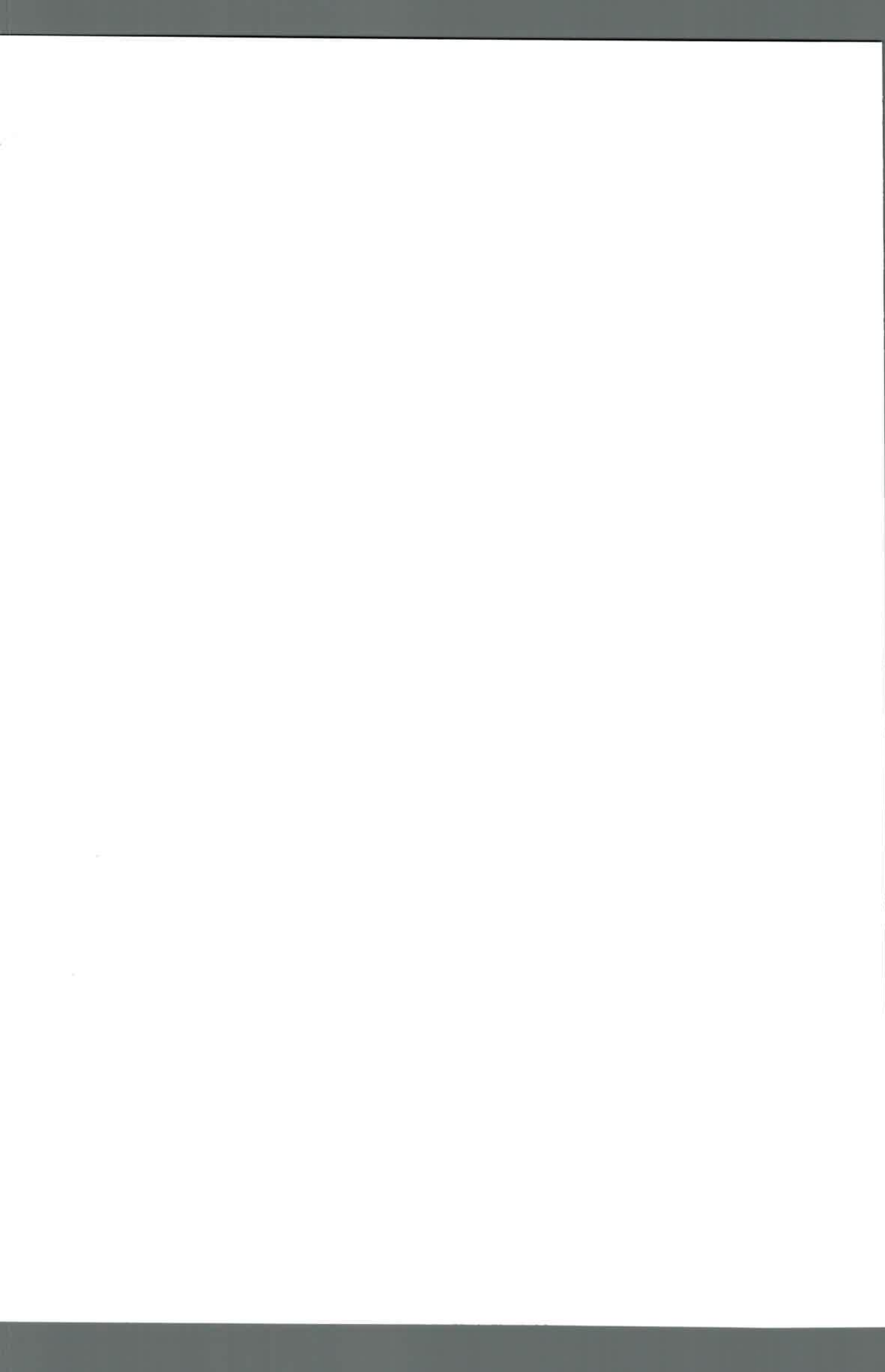
Sin embargo, se debe tener en cuenta que las endonucleasas utilizadas en estos experimentos hidrolizan al genoma huésped en numerosos sitios (ya que reconocen sitios de restricción de unos pocos pares de bases) con los consiguientes efectos deletéreos. Por este motivo, la dosis de la endonucleasa debe ser ajustada cuidadosamente para lograr la máxima tasa de integración sin afectar el desarrollo



embrionario. Como alternativa a estas endonucleasas que pueden causar daño al fraccionar el genoma, se pueden emplear otras enzimas de restricción conocidas como meganucleasas; cuyo nombre se deriva por que reconocen sitios de restricción de más de 12 pares de bases. Al reconocer una secuencia larga, en comparación con las endonucleasas convencionales; la posibilidad de que exista el sitio en el genoma de un animal es prácticamente nula (la probabilidad de encontrar una determinada secuencia de 12 nucleótidos en el ADN es $[1/4]^{12}$; es decir 1 en 16.777.216).

Meganucleasa I-SceI

La meganucleasa I-SceI pertenece a la familia de las llamadas endonucleasas *homing*, siendo quizás una de las mejor caracterizadas. La I-SceI se encuentra codificada por el intrón I del ARNr 21s de *Saccharomyces cerevisiae*, y su expresión resulta del corte y empalme del ARN. Las endonucleasas *homing*, actúan sobre el propio ADN de la célula que la sintetiza, para ser más preciso, en el alelo opuesto del gen que las codifica. La figura 2 esquematiza como esta familia de enzimas media la propagación del intrón escindiendo los genes en los lugares donde se va a introducir dichas secuencias. Igual que las enzimas de restricción, las endonucleasas *homing* cortan la doble cadena de ADN con alta especificidad en presencia de iones divalentes. Sin embargo, estas difieren de las enzimas de restricción convencionales tipo II en sus propiedades de reconocimiento y en su estructura, como así también en su localización dentro del genoma. En particular, mientras que las enzimas de restricción convencionales tienen secuencias de reconocimiento cortas (4 a 12 pb), y normalmente simétricas, las endonucleasas *homing*, a pesar de su pequeño tamaño reconocen secuencias de ADN asimétricas y de gran longitud (12 a 40 pb). Teóricamente, una secuencia de reconocimiento de 18 pb (como la que reconoce la I-SceI) aparece una vez cada 70 billones de bases en una secuencia aleatoria. Los genomas de vertebrados analizados (Cohen-Tannoudji., 1998; Moynahan, y col., 2001) hasta la fecha, incluyendo el pez medaka y a la rana *Xenopus* (Thermes y col., 2002; Ogino y col., 2006) no contienen sitios para el reconocimiento de la meganucleasa I-SceI; esto elimina el riesgo de que el genoma sea fraccionado por la enzima (Grosse y col., 2011; Arnould y col., 2007; 2011).



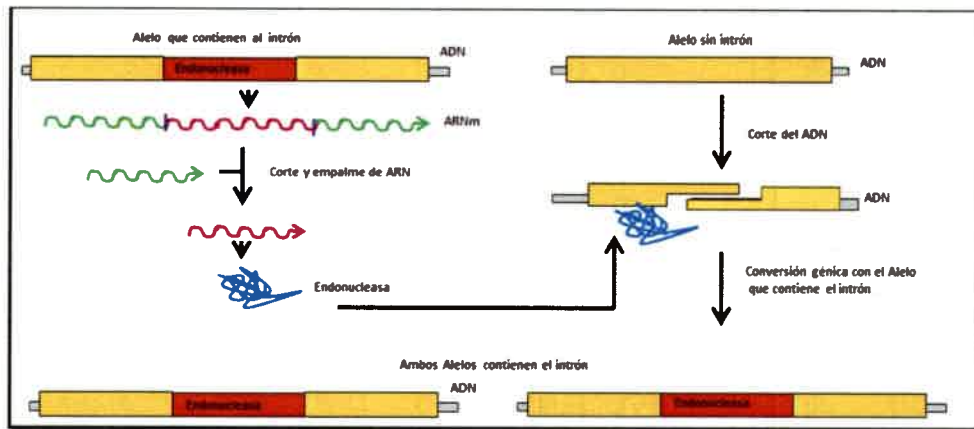


Figura 2. Mecanismo general de *homing* de intrones. Una endonucleasa sitio-específico se produce a partir del intrón de un alelo de un gen. La endonucleasa reconoce y corta la versión sin intrón del mismo gen en el sitio de inserción del Intrón, iniciando el evento de conversión génica con el alelo que contiene al Intrón. El sitio de reconocimiento, en el borde de los dos exones, es no palindrómico y frecuentemente complejo. Así, las endonucleasas *homing*, tienen muchos menos sitios en genomas complejos en comparación con las enzimas de restricción bacterianas. (Esquema adaptado de Jurica & Stoddard., 1999, *Homing endonucleases: structure, function and evolution*)

Los eventos de mutación dirigida o transgénesis ocurren cuando se produce un corte en la doble hebra del ADN (DSB, del inglés *Double Strand Break*). Como resultado de este corte la célula reclutará la maquinaria natural de reparación al mismo, y este podrá ser reparado por RH, o por unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*). La RH utiliza un segmento homólogo de ADN no dañado como “molde” para copiar la información faltante en la región de la ruptura. El segmento homólogo es generalmente una cromátida hermana pero también puede ser una molécula de ADN introducida artificialmente. A través de NHEJ se unen directamente los extremos donde se produjo el corte, dando como resultado un arreglo fidedigno, una eliminación o una introducción de nucleótidos (Kervestin y col., 2012).

La meganucleasa genera DSB simultáneamente en el genoma del organismo hospedador y el ADN exógeno, permitiendo la integración del transgén mediante mecanismos de reparación. La introducción de la meganucleasa y la generación de DSB en lugares específicos del genoma llamados hotspots (puntos calientes) todavía no ha sido bien analizada (Grabher & Wittbrodt., 2007).



Se ha desarrollado una técnica simple, rápida y eficiente en el pez medaka que permite la generación de líneas transgénicas estables mediante la co-inyección de la proteína I-SceI con el vector reportero, estando este último flanqueado en ambos extremos por sitios de reconocimiento para la meganucleasa. El estudio del efecto de la meganucleasa en la eficiencia de la transgénesis se ha llevado a cabo exitosamente en varias clases de peces (medaka, stickleback, zebrafish), anfibios (axolotes y xenopus) y ascidians (ciona) (Thermes y col., 2002; Grabher y col., 2004 ; ver Figura 3). Comparado con las inyecciones convencionales de ADN, al aplicar el protocolo de la meganucleasa, incrementa el número de individuos que expresan el transgén pasadas las 24 hs luego de la fertilización. Adicionalmente, el nivel de mosaicismo se reduce significativamente luego de 48 hs de efectuada la inyección. La transgénesis mediada por la meganucleasa en medaka da como resultado, una transmisión del 25% al 50% a la línea germinal, indicando que la I-SceI facilita eficientemente la integración funcional temprana del transgén.

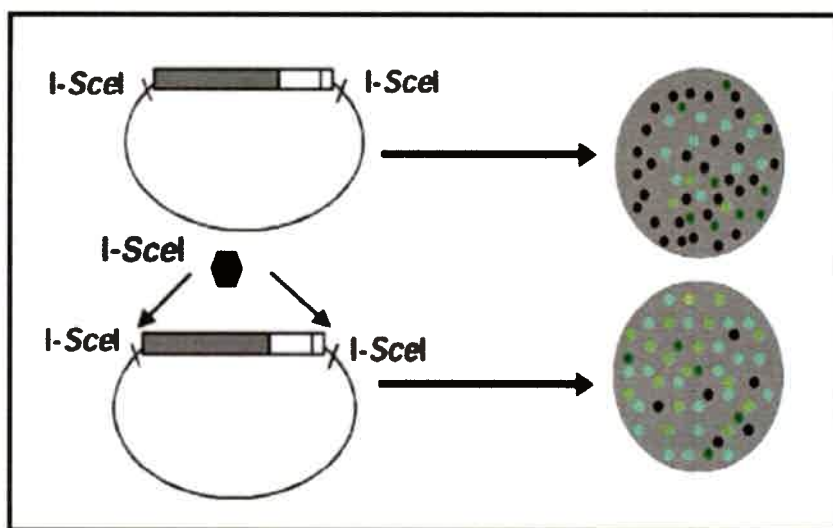


Figura 3. Mecanismo de acción de la endonucleasa homing I-SceI. La co-inyección de un transgén flanqueado con los sitios de reconocimiento de la meganucleasa, acompañado de la I-SceI aumenta el número de embriones que expresan la proteína fluorescente verde, (GFP o *green fluorescent protein*) Figura extraída del artículo Thermes y col., 2002.

Al mismo tiempo, existen evidencias experimentales que indican que la escisión de la doble hebra de ADN por una enzima de restricción de baja frecuencia de corte, incrementa la ocurrencia de fenómenos recombinatorios en las zonas próximas al

sito de corte (Smih y col., 1995; Cohen-Tannoudji y col., 1998). En estos experimentos se crearon sitios de restricción sintéticos para una meganucleasa dentro del genoma de células de ratón y humanas (especies que no poseen naturalmente sitios de reconocimiento para dicha meganucleasa). Cuando la meganucleasa fue incorporada a las células junto a un transgén (contiendo secuencias homólogas) se observó un incremento marcado en la frecuencia de fenómenos de RH en la proximidad del sitio de corte de la endonucleasa (Rouet y col., 1994; Smih y col., 1995). Esto mismo fue comprobado mediante la creación de un locus artificial con el sitio de reconocimiento de la meganucleasa en el genoma del tabaco. La expresión de la meganucleasa resultó en un aumento de 100 veces en la frecuencia de la integración de ADN (Grabher y col., 2004).

“Transgénesis Activa” Uso de la Meganucleasa I-SceI

Empleando ICSI-SMGT se ha demostrado una eficiente producción de animales transgénicos con una transmisión del transgén en aproximadamente el 45% de los animales nacidos (Shinohara y col., 2007). Dado que algunos de los animales producidos por métodos pasivos de transgénesis, como la microinyección pronuclear, o ICSI-SMGT son mosaicos se ha desarrollado una técnica, denominada “Transgénesis activa” la cual combina ICSI-SMGT con la integración enzimática del transgén con el fin de incrementar la eficiencia de la transmisión genética. Algunas de las enzimas utilizadas son las proteínas transposasas (transposasa hiperactiva Tn5) (Suganuma y col., 2005) o recombinasas (RecA) (Kaneko y col., 2005).

La aplicación del principio de transgénesis activa en biotecnologías reproductivas de animales mayores podría conducir al desarrollo de estrategias que permitan aumentar significativamente la eficiencia de procesos de integración o recombinatorios para la producción de animales transgénicos.

El objetivo de los experimentos presentados en este capítulo fue generar embriones transgénicos mediante TNCS e ICSI-SMGT en bovinos, con el fin de ofrecer nuevas metodologías aplicables a la reproducción y transgénesis animal mediante una metodología emergente basada en el uso de enzimas de restricción, sistema recientemente incorporado a la transgénesis en mamíferos. Finalmente, se puso a punto un nuevo protocolo de sexado (PGD) empleando líquido blastocélico de los embriones

generados por ICSI-SMGT con asistencia química y así descartar la posible generación de embriones partenogénicos producto de la activación química.

OBJETIVOS GENERALES



Objetivos generales

El presente plan de trabajo se encuadra en un proyecto general más amplio, el cual persigue desarrollar e implementar métodos alternativos para introducir modificaciones génicas más eficientemente en células en cultivo y a la vez incorporar métodos que conlleven un incremento en la eficiencia en la integración de nuevo material genético al genoma de embriones bovinos. Aquellas células genéticamente manipuladas se utilizarán en futuros experimentos como donantes de núcleos para generar animales clonados transgénicos mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas. Por otra parte los embriones transgénicos producidos *in vitro* mediante estos métodos, darán origen, luego de su transferencia a madres sustitutas, a animales transgénicos para aplicaciones en el campo de la biomedicina y la producción animal.

Los experimentos propuestos persiguen estudiar el efecto de las endonucleasas sobre la eficiencia de integración de ADN heterólogo en células bovinas en cultivo. El conocimiento generado a partir de este trabajo será de valor para profundizar y avanzar en los estudios de transgénesis mediada por enzimas de restricción.

Capítulo I

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

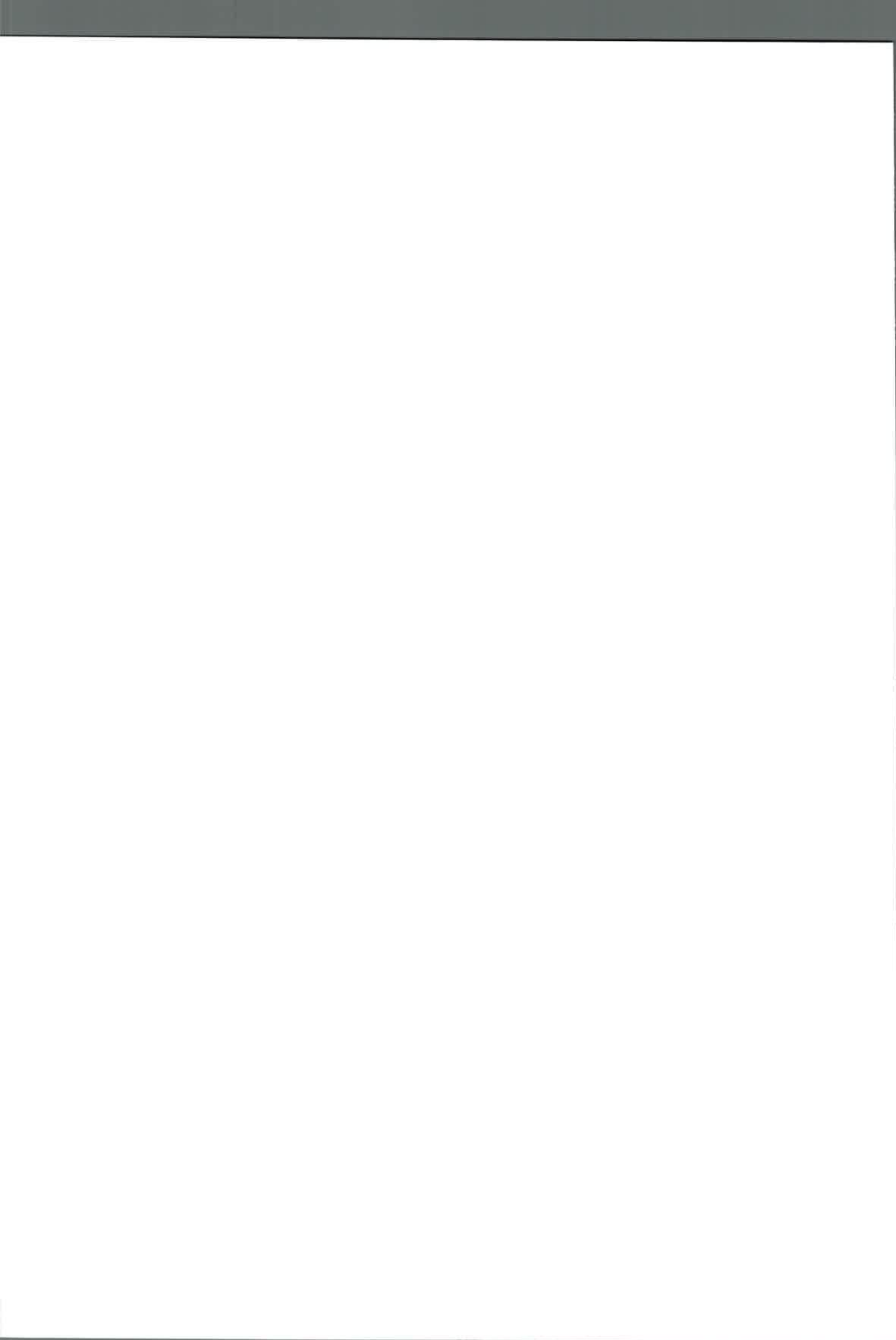


Objetivos específicos

- a) Optimizar las condiciones que conducen a maximizar la incorporación de ADN al interior de fibroblastos bovinos en cultivo mediante métodos químicos (GeneJammer) o físicos (electroporación).
- b) Establecer una metodología transgénica basada en la presencia simultánea de una endonucleasa y un transgén (flanqueado por sitios de restricción para la misma enzima) en el interior de células en cultivo.
- c) Estudiar la eficiencia del método descrito en el objetivo b) para generar líneas fibroblásticas transgénicas estables (número de células que expresan el transgén/ número total de células transfectadas).
- d) Determinar si la incorporación simultánea al interior del ovocito del transgén flanqueado por sitios de restricción (para la enzima I-SceI o BssHII) más la endonucleasa correspondiente, durante la técnica de ICSI, puede mejorar la eficiencia de integración del transgén en embriones bovinos generados mediante esta metodología.
- e) Comparar la expresión del transgén y las características de integración del mismo (número de sitios y de copias), a partir embriones bovinos generados por inyección de espermatozoides previamente incubados con el transgén y una endonucleasa con alta frecuencia de escisión (Ej. BssHII) o una de muy baja frecuencia de corte (Ej. I-SceI

Capítulo I

MATERIALES Y MÉTODOS



Materiales y Métodos

Reactivos

Todos los reactivos utilizados excepto cuando se especifica lo contrario, fueron adquiridos en Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EE.UU.).

Experimentos preliminares

En experimentos preliminares se evaluó la tasa de transfección de fibroblastos fetales bovinos (FFB) por métodos químicos, físicos, empleando vectores virales y manipulando el ciclo celular (Ortega y col., 2011; Scilingo y col., 2011; Forcato y col., 2012). Utilizamos el plásmido pZsGreen1-N1 (clontech Laboratories. Inc, portador de un casete de expresión de una proteína reportera fluorescente verde. Se emplearon diferentes agentes policatiónicos: *GeneJammer*[®] (Stratagene), *FuGene*[®] (Roche), polietilenimina (PEI[®]) y *Lipofectamine*[®] 2000 (Invitrogen) y se estudiaron diversos protocolos de electroporación. En cada experimento se determinó la proporción de reactivo (μl)/ADN (μg), o las condiciones que permitieron generar la mayor tasa de transfección, según corresponda, con el menor nivel de toxicidad sobre los FFB en cultivo.

Con el objetivo de determinar si el sitio(s) de clivaje de la meganucleasa I-SceI (TAGGGATAACAGGGTAAT) está presente en el genoma bovino, se recurrió a un análisis *in silico* empleando la base de datos BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*). De acuerdo a este análisis, la secuencia de reconocimiento de la meganucleasa I-SceI no estaría presente en las secuencias genómicas bovinas (*Bos Taurus*) depositadas en las bases de datos disponibles.

Se realizó la construcción mediante ingeniería genética del vector de expresión denominado I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo de 6113 pb, en el cual un casete de resistencia a neomicina (Neo^r) quedó ubicado corriente abajo de un casete para la expresión de la proteína fluorescente verde (ZsGreen1) bajo el control del promotor citomegalovirus (CMV). Ambos genes quedaron flanqueados por sitios de

reconocimiento de las enzimas de restricción I-SceI y BssHII, Asimismo generamos a partir del vector pCBASce, el plásmido control pCBA, que carece de las secuencias codificantes para la meganucleasa I-SceI (ver Figura 4).

Diseño experimental

Nos propusimos poner a prueba nuestra hipótesis general de trabajo en dos sistemas diferentes por lo cual subdividimos éste primer capítulo en tres etapas: Etapas 1 y 2: sobre fibroblastos bovinos en cultivo –tipo celular de elección para producir animales clonados mediante la técnica de transferencia nuclear; y Etapa 3: transgénesis mediada por espermatozoides.

ETAPA 1: Desarrollar una estrategia para manipular genéticamente células somáticas en cultivo primario empleando enzimas de restricción, orientado a la producción futura de animales transgénicos mediante la técnica de transferencia nuclear.

EXPERIMENTO 1: Establecimiento de líneas de células somáticas modificadas genéticamente empleando un sistema mediado por la meganucleasa I-SceI.

El experimento 1 se basa en la incorporación del transgén (casetes de expresión de ZsGreen1 y Neo) a células que expresan de manera transitoria la enzima de restricción I-SceI a partir de un vector (pCBASce). Fibroblastos fetales bovinos se transfectaron solamente con el vector I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo (T1), el vector más el plásmido control pCBA (T3) o el vector más el plásmido pCBASce (T2). Para las co-transfecciones se probaron relaciones de transfección 1:1 y 1:3 de los plásmidos (I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+ pCBA o pCBASce según corresponda). Luego de 72 horas se evaluó la tasa de transfección transitoria mediante citometría de flujo. Se realizaron ensayos de *Western blot* y ADN cometa. Las células se repicaron a placas de cultivo y se cultivaron en medio suplementado con el antibiótico para selección positiva (G418). Bajo estas condiciones sobreviven y proliferan solamente las células que han adquirido el casete de resistencia a neomicina. Se evaluó la tasa de transfección estable, es decir la proporción de células que han integrado y expresan el transgén. A los 14-18

días las colonias celulares se recuperaron mediante el uso de anillos para clonado (“cloning rings”) y fueron transferidas a placas para su propagación).

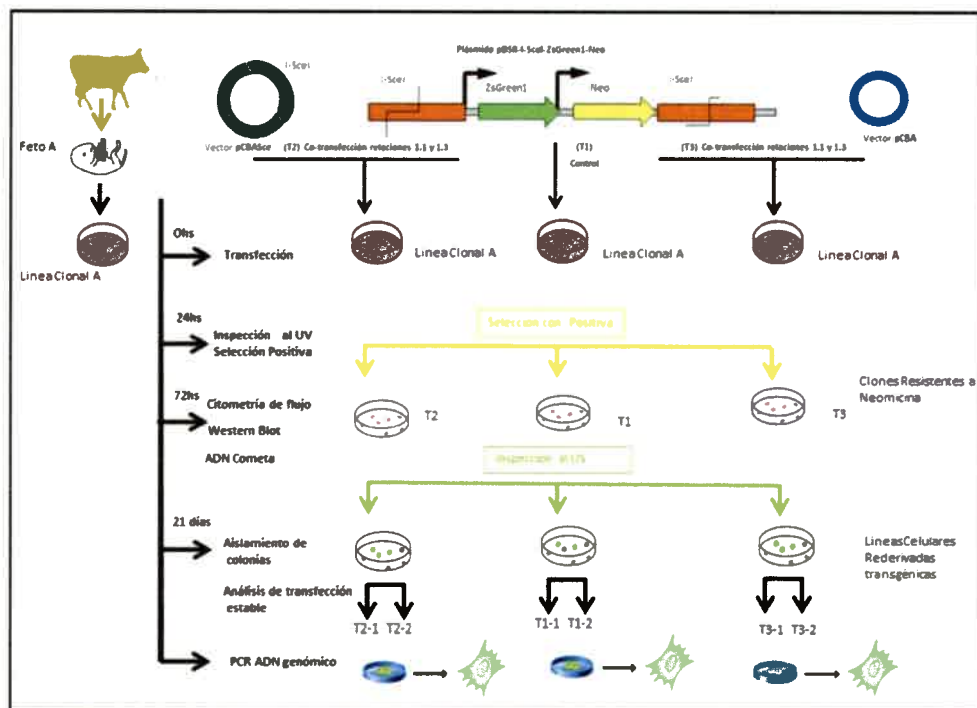


Figura 4. Experimento 1. Establecimiento de líneas de células somáticas modificadas genéticamente empleando enzimas de restricción.

EXPERIMENTO 2: Generación de una línea celular bovina que produzca de manera constitutiva la meganucleasa I-SceI.

Se utilizó el plásmido denominado pNG26i (Graham y col., 2003), el cual ha sido gentilmente cedido por la Dra. Chiara Mondello (Istituto di Genética Molecolare of CNR, Pavia, Italy). Este vector de 6570 pb contiene casetes de expresión de la meganucleasa I-SceI con un tag (epítoto de la hemoaglutinina -HA-) para detección por Western blot, y un casete para la expresión de higromicina fosfotransferasa bajo el control del promotor CMV que confiere resistencia a higromicina.

Se transfectaron FFB con el plásmido pNG26i en sus dos formas: circular covalente cerrado (CCC) y linearizado por digestión previa con la enzima de restricción SpeI. Se realizó selección positiva con higromicina B y se analizó el número de colonias resistentes al antibiótico. La expresión de la meganucleasa se verificó por *Western blot*.

De esta manera se generaron líneas celulares bovinas que producen de manera constitutiva la meganucleasa I-SceI.

ETAPA 2: Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas (clonación).

EXPERIMENTO 3: Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas.

El experimento 3 fue realizado de acuerdo con los protocolos de Cánepa-Ortega y col., 2014 y se resume en la figura 5.

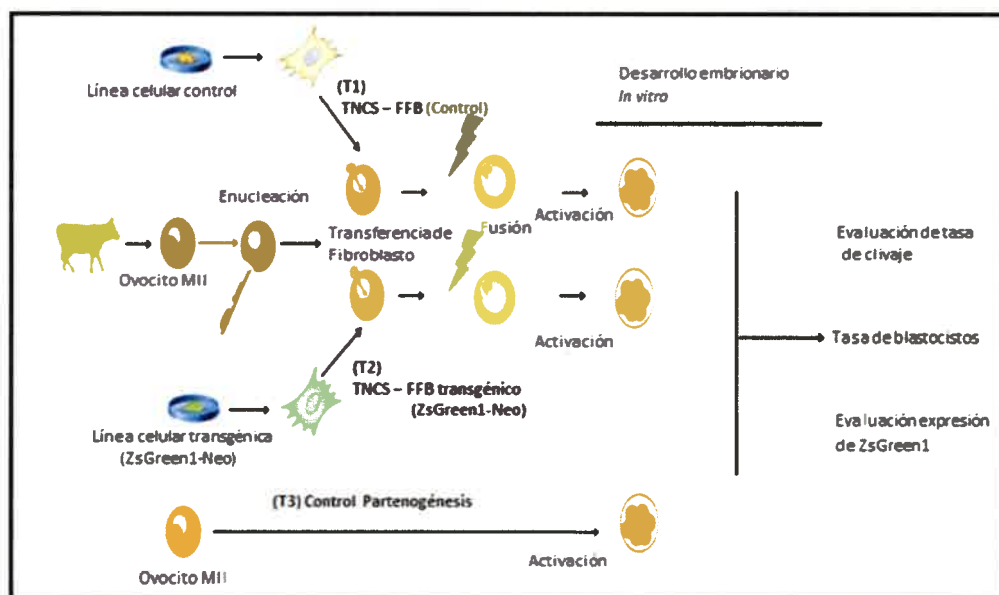


Figura 5. Experimento 3. Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas (clonación). Tratamiento 1 (T1): Cigotos reconstituidos por TNCS empleando como células donantes de núcleos a fibroblastos fetales bovinos sin transfectar (control). Tratamiento 2 (T2): Cigotos reconstituidos por TNCS empleando como células donantes fibroblastos fetales bovinos modificados genéticamente empleando enzimas de restricción. Tratamiento 3 (T3): Cigotos generados por activación partenogénica (control del proceso de activación de los ovocitos y del medio de cultivo embrionario). Para todos los tratamientos se determinaron las tasas de clivaje y desarrollo embrionario, y la expresión de la proteína verde reportera ZsGreen1 según corresponda.

ETAPA 3: Ovocitos bovinos en metafase II se inyectaron con espermatozoides previamente incubados con el vector I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo (ZsGreen1-Neo) en presencia de una enzima de restricción de baja o alta frecuencia de corte dependiendo del experimento. Los ovocitos inyectados con un espermatozoide fueron activados químicamente mediante un tratamiento con ionomicina (Io) seguido de una incubación con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP).

EXPERIMENTO 4: Se evaluó la tasa de transgénesis mediada por ICSI en presencia de una enzima de restricción de muy baja frecuencia de corte del ADN (reconoce un sitio de restricción de 18 pb).

Tratamiento 1 (T1): Se inyectó solamente un espermatozoide dentro de un ovocito maduro. Los resultados permitieron determinar posibles efectos deletéreos que pudieran causar el transgén o el transgén más la enzima de restricción (I-SceI) sobre los embriones.

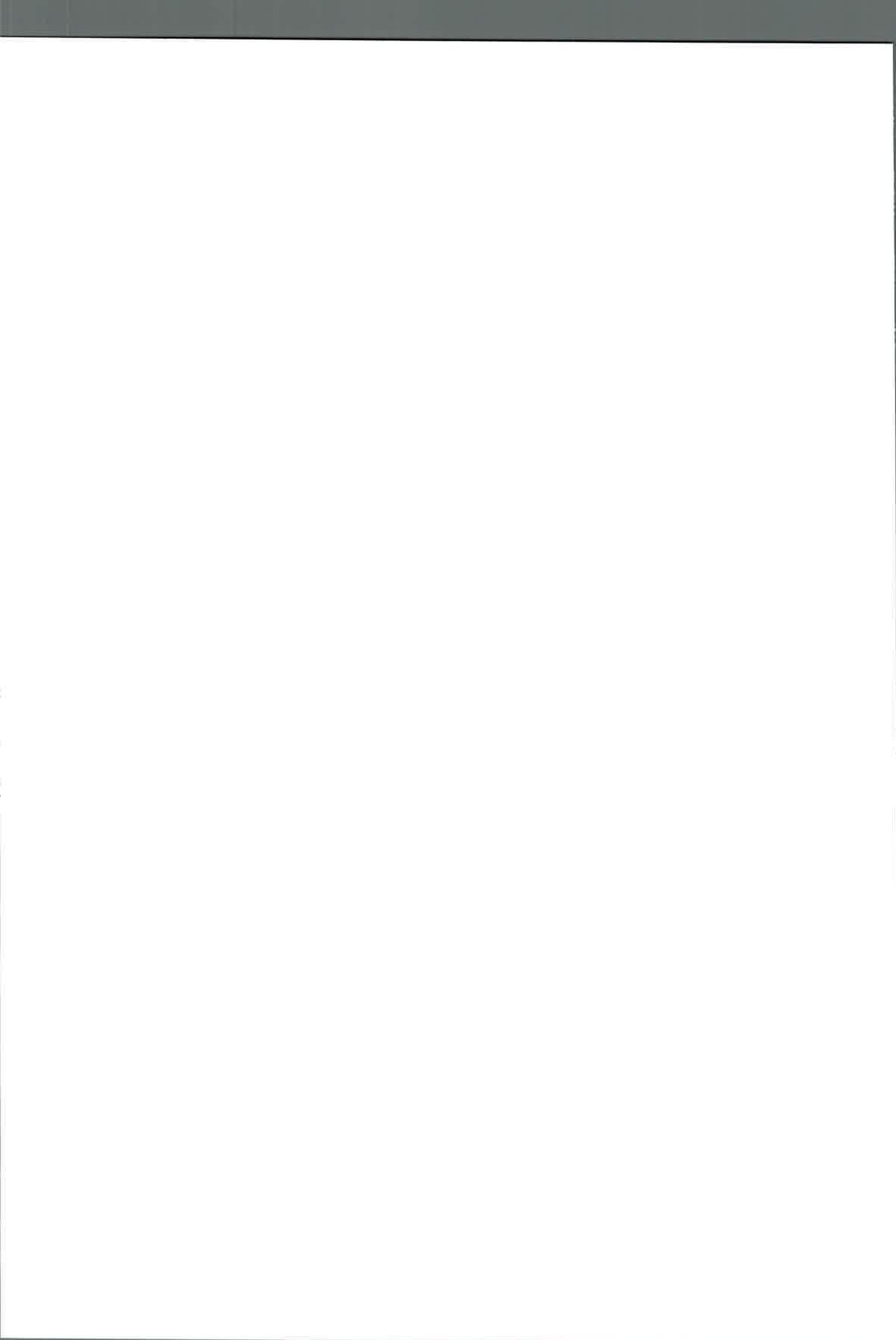
Tratamiento 2 (T2): Los espermatozoides se incubaron con la construcción I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en su conformación circular covalente cerrada (CCC) y posteriormente un espermatozoide fue inyectado en el citoplasma de un ovocito maduro MII.

Tratamiento 3 (T3): Los espermatozoides se incubaron con la construcción I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo (CCC) en presencia de la meganucleasa I-SceI antes de ser inyectados individualmente en ovocitos maduros MII.

Tratamiento 4 (T4): Los espermatozoides se incubaron con la mezcla de digestión del vector I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo por la meganucleasa antes de ser inyectados individualmente en ovocitos maduros MII.

Tratamiento 5 (T5): Control del proceso de activación de los ovocitos MII y del medio de cultivo embrionario. Embriones generados por activación partenogénica.

EXPERIMENTO 5: Se evaluó la transgénesis mediada por ICSI cuando se emplea una enzima de restricción de alta frecuencia de escisión del ADN (reconoce un sitio de restricción de 6 pb).



Tratamiento 1 (T1): Para determinar posibles efectos deletéreos que pudieran causar el transgén o transgén más la enzima de restricción (BssHII) sobre los embriones, se inyectó solamente un espermatozoide dentro de un ovocito maduro.

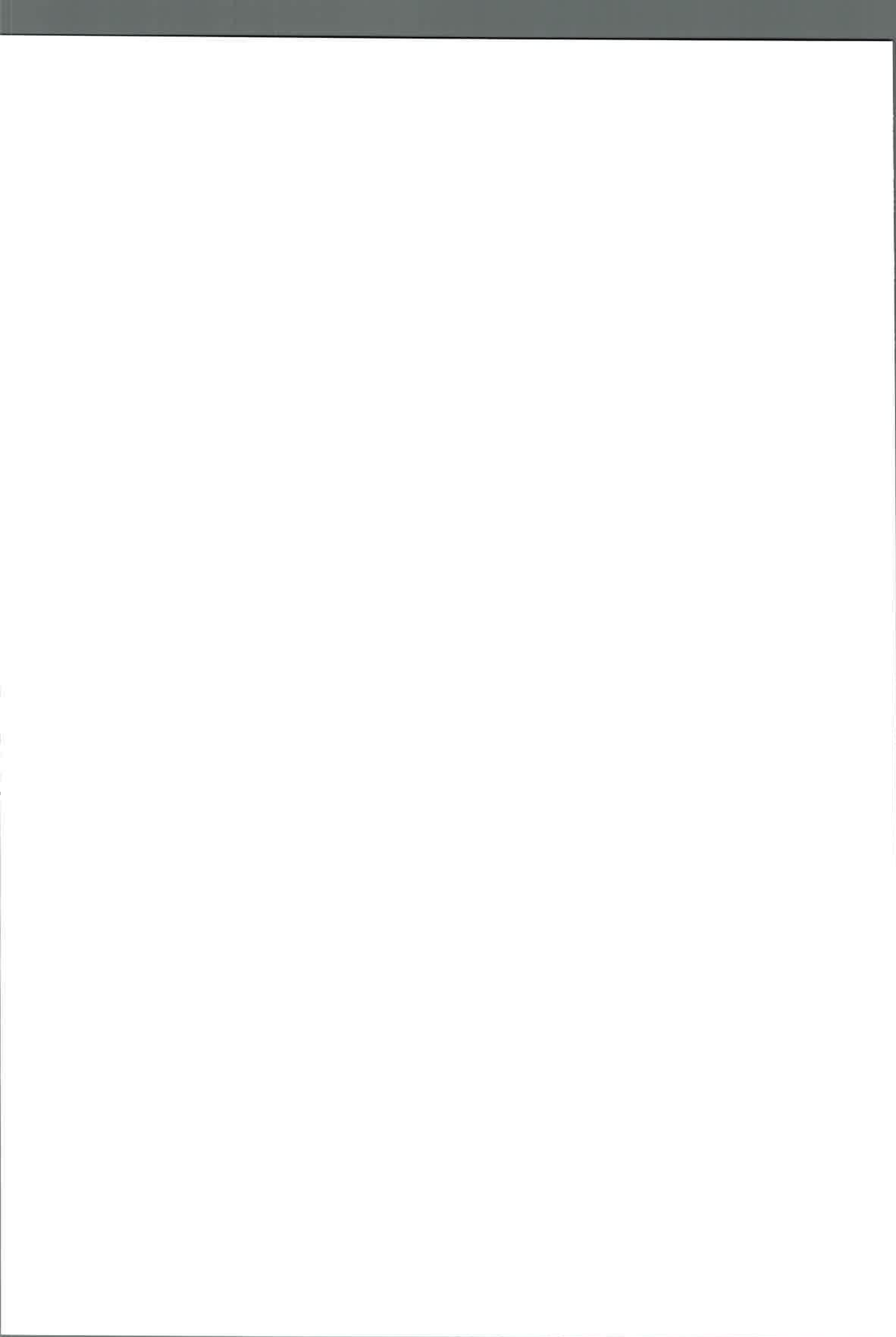
Tratamiento2 (T2): Los espermatozoides se incubaron con la construcción I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en su conformación circular covalente cerrada (CCC) y posteriormente un solo espermatozoide se inyectó en el citoplasma de un ovocito maduro MII.

Tratamiento3 (T3): Los espermatozoides se incubaron con la construcción I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo(CCC) en presencia de la endonucleasa BssHII antes de ser inyectados individualmente en ovocitos maduros.

Tratamiento 4 (T4): ICSI – Inyección de espermatozoide + mezcla de digestión del vector I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo con la enzima BssHII.

Tratamiento 5 (T5): Activación partenogenética.

En todos los experimentos de las etapas 2 y 3, se evaluaron parámetros de calidad embrionaria. Se determinó por inspección en lupa estereoscópica el porcentaje de ovocitos fertilizados que se dividieron a las 48 horas de practicada la TNCS o la ICSI según corresponda. Del mismo modo se evaluó el número de embriones que alcanzaron el estadio de mórula/blastocisto a las 168 horas de cultivo. En el día 4, 6 y 8 se inspeccionaron los embriones en un microscopio invertido con luz UV y filtros apropiados para la detección de la proteína fluorescente ZsGreen1. Se registró el número de embriones fluorescentes verde y dentro de estos se determinó si todas o algunas blastómeras expresaban ZsGreen1; es decir se determinaron las características temporoespaciales de la expresión del transgén en los embriones en desarrollo. A modo de control se evaluaron blastocistos derivados de FIV y de activación partenogénica. Finalmente, para el experimento 4 se puso a punto un nuevo protocolo de diagnóstico genético preimplantacional (DGP) empleando líquido blastocélico de los embriones generados por ICSI-SMGT con activación química, para poder sexar a los mismo, y así descartar la posible generación de embriones partenogénicos producto de la activación química.



Construcciones plasmídicas

Generamos el plásmido de interés I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo que contiene los transgenes ZsGreen1 (proteína fluorescente) y Neo^r (resistencia a neomicina) flanqueados por sitios de restricción para la meganucleasa I-SceI. Las secuencias que codifican para ZsGreen1 bajo el control del promotor citomegalovirus (CMV) (1620 pb) y Neo^r (1400 pb) , fueron amplificadas por PCR a partir del vector pZsGreen1-N1 (Clontech) con oligonucleótidos específicos, y purificadas de gel empleando el kit GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Ambos genes fueron clonados en el sitio múltiple de clonado (MCS) ubicado entre los 2 sitios de restricción para la meganucleasa I-SceI presentes en el plásmido receptor I-SceI-pBSII-SK+ gentilmente cedido por el Dr. Jochen Wittbrodt, Alemania. Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico iCycler™ BIO-RAD. Para reducir la probabilidad de introducción de mutaciones durante la PCR, se utilizó una polimerasa de alta fidelidad con capacidad exonucleasa 3'→5' proofreading (*pfu* DNA Polymerase, *Fermentas*). Los productos de la reacción de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* competentes por calcio y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina. A partir de dichas colonias, se aisló ADN plasmídico. De esta manera se generó el vector denominado I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo, de 6113 pb en el cual los casetes para expresión de ZsGreen1 y Neo^r quedaron flanqueados por sitios de restricción para I-SceI y BssHIII. Este plásmido se utilizó en la transfección de los FFB y en los experimentos de ICSI (Figura 6)

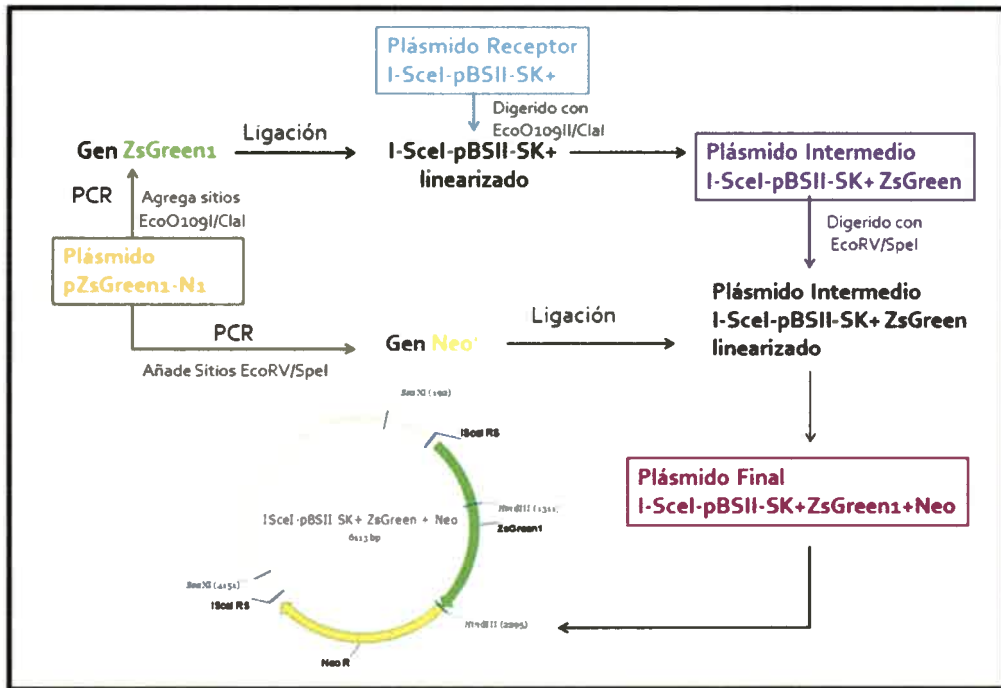


Figura 6. Esquema de la estrategia de construcción del vector de expresión I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo. El vector de expresión, se construyó a partir de los plásmidos pZsGreen1-N1 e I-SceI-pBSII-SK+.

En la Figura 7 se muestran todos los plásmidos utilizados en este capítulo. Adicionalmente, se construyó también el plásmido pCBA el cual carece del sitio codificante de I-SceI y del epítipo de hemaglutinina. Es una construcción plasmídica control derivada del vector de expresión pCBASce (5656pb), digerido con la enzima EcoRI. Producto de la hidrólisis, se liberaron dos fragmentos: uno de 878 pb, (que incluye la secuencia que codifica la I-SceI junto con el epítipo de Hemaglutinina) y un segundo fragmento de 4778pb que se corresponde con el esqueleto del plásmido. Éste último se extrajo a partir del gel y luego se purificó mediante kit comercial. Finalmente, se ligaron los extremos de este fragmento lineal por acción de la enzima T4 DNA ligasa. Los productos de ligación se utilizaron para transformar células *E. coli* DH5 α competentes y a las colonias transformadas se les realizó minipreparación para obtener el ADN plasmídico.

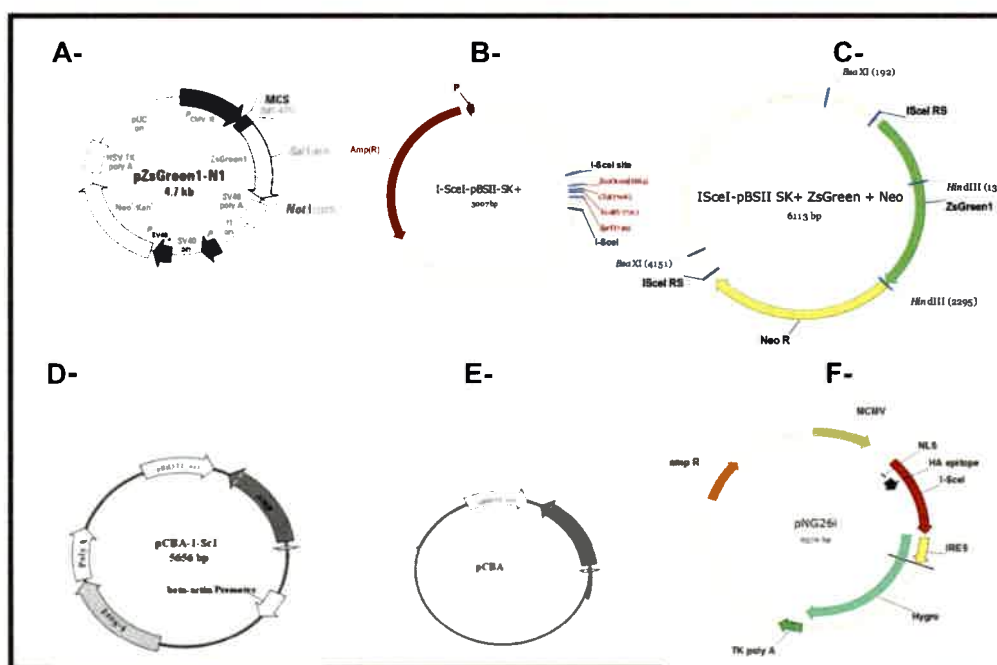


Figura 7. Plásmidos Utilizados en este capítulo. (A) pZsGreen1; (B) I-SceI-pBSII-SK+ ; (C) I-SceI-pBSII-SK+ ZsGreen1+Neo; (D) pCBA-Sce; (E) pCBA; (F) pNG26i.

Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos fetales bovinos

Se colectaron fetos de 40-60 días de edad gestacional de hembras bovinas faenadas en un frigorífico local. La cabeza y los órganos internos de los fetos fueron removidos y descartados mientras que los tejidos restantes se cortaron finamente y fueron digeridos en una solución de tripsina y EDTA 0,25% (GIBCO, USA) en buffer fosfato salino de Dulbecco libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . El procesamiento de los fetos y la generación de líneas de fibroblastos fetales bovinos (FFB) se muestran en la figura 8. Las células obtenidas luego de la digestión enzimática, se cultivaron en medio de crecimiento DMEM alta glucosa (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB), (GIBCO, USA) y 50 μ g/mL de gentamicina y 50 μ g/mL de micostatina. Las células se transfirieron a frascos plásticos para su cultivo en estufa a 38,5 °C y 5% CO_2 . Los cultivos se tripsinizaron al alcanzar la confluencia y las células se repicaron a frascos nuevos para continuar su cultivo.



Figura 8. Cultivo primario. Procesamiento de los fetos y generación de líneas de fibroblastos fetales bovinos.

Los FFB fueron utilizados en los experimentos de transfección directamente cuando los cultivos se encontraron entre los pasajes 3 al 10. Alternativamente, fueron congelados mediante procedimientos de criopreservación estándares y mantenidos en nitrógeno líquido en 10 % DMSO y 90 % SFB hasta su utilización.

Transfección de fibroblastos fetales bovinos

Las células se cultivaron en policubetas de 24 pocillos, se sembraron 5×10^4 células/pozo en medio de crecimiento hasta obtener una confluencia aproximada del 80%. Las células se transfectaron con Lipofectamina de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De los experimentos preliminares se decidió emplear la relación 2,5/1 como la concentración óptima del complejo Lipofectamina (μL)/ADN (μg). Por otro lado, se evaluaron distintas relaciones 1:1 y 1:3 de los plásmidos (I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+: pCBA o PCBASce según corresponda) en un volumen final de 100 μL de medio mínimo en tubos Eppendorf estériles (uno por cada tratamiento, manteniendo como concentración final 500 ng de ADN/well). En el experimento cuyo objetivo fue la obtención de líneas celulares bovinas transgénicas que expresan constitutivamente la endonucleasa I-SceI, los FFB se transfectaron con el plásmido pNG26i circularizado o lineal.

Previo a los experimentos de transfección se realizó un análisis de la resistencia de los FFB derivados del cultivo primario cultivados en diferentes concentraciones de antibióticos neomicina G418 e higromicina B con el fin de obtener la menor dosis del antibiótico que produce la muerte celular, conocida como dosis letal mínima (DLM): Neo^r (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Higromicina B 50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Se mantuvieron los FFB transfectados en cultivo durante 15-20 días, realizando cambios del medio de selección cada 3 días.

Se determinó el número de colonias celulares resistentes al antibiótico que desarrollaron durante el cultivo. Se seleccionaron y se aislaron líneas transgénicas mediante el uso de "cloning discs" y se cultivaron en placas de 12 pozos.

Electroforesis alcalina en células individuales

El ensayo cometa fue llevado a cabo de acuerdo al método descrito por Singh y col., 1988, brevemente, las células fueron mezcladas con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF, 0,75% en agua destilada a 37°C) en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Luego se procedió a sembrar esta mezcla en los portaobjetos que fueron previamente cubiertos con una delgada capa de agarosa de punto de fusión normal (APFN, 0,75% en agua destilada). Finalmente se agregó al portaobjeto otra capa de ABPF y se lo cubrió con un cubreobjetos. Una vez que la agarosa hubo solidificado, se retiró el cubreobjetos y se colocaron los portaobjetos en solución de lisis fría (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10, Tritón X-100 al 1% y DMSO al 10%) donde permanecieron a 4° C al menos durante una hora. Luego se transfirieron los portaobjetos a la cubeta de electroforesis con una solución alcalina a pH 13 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA). En esta solución permanecieron durante 20 min, a 4°C en oscuridad para que ocurra el desenrollamiento del ADN. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la corrida electroforética a 30 V, 250 mA durante 25 minutos. La tinción de los preparados se realizó con 50 μ l de bromuro de etidio (20 μ g/mL) inmediatamente antes de su análisis. Los preparados se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia para poder determinar el efecto de la transfección con un plásmido que codifica para la expresión de la meganucleasa I-SceI sobre el ADN genómico de los FFB en cultivo.

Citometría de flujo

Setenta y dos horas después de la transfección se determinó la proporción de FFB que expresaron ZsGreen1 y la intensidad de la emisión fluorescente (esta última indica el nivel de expresión de la proteína trazadora) mediante citometría de flujo, Para ello, las células fueron tripsinizadas y suspendidas en una solución de paraformaldehído al 2% en PBS previo al análisis citométrico. Como método alternativo, se utilizó el conteo de células en cámara de Neubauer. En este último caso, se determinó el número

de FFB fluorescentes y posteriormente el número total para determinar el porcentaje de células que expresan el transgén.

Western blot

Para determinar la expresión de la meganucleasa I-SceI por Western blot, se preparó un extracto celular de cultivos transfectados con el plásmido pCBASce o pNG26i. Para esto, se realizaron dos lavados de la monocapa celular con PBS, se despegaron las células por tripsinización, se colectaron y se centrifugaron a 100g durante 1 minuto para sedimentar las células y descartar el sobrenadante. A continuación, se lavaron las células con 1 mL de PBS, se centrifugaron a 100g durante 1 minuto, y el sedimento se resuspendió en 100 mL de buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0,1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM EDTA, cocktail inhibidor de proteasas). Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.

Posteriormente, se realizaron geles discontinuos SDS-PAGE, empleando un equipo MiniProtean® 2 (BIO-RAD). El gel de resolución usado fue de 12%. El gel de apilamiento fue de 4%. Se sembraron 30 mg de proteínas por calle y en paralelo un marcador de amplio rango de peso molecular (Rainbow, Amersham).

Antes del sembrado, las muestras se sometieron a 100°C durante 5 minutos en buffer muestra. La electroforesis se efectuó a 160 V durante 1 h 15 min. Luego de la corrida electroforética se recuperaron los geles para realizar la transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa (Amersham™, Hybond™, ECL) a una intensidad de 250 mA constantes. Se corroboró la transferencia mediante tinción de la membrana con rojo Ponceau.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo (5% leche descremada en PBS 1X 0,1% Tween, denominada PBS-T). Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS-T, durante 2 h. Luego de 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno, se incubó con el anticuerpo secundario por una hora, también a temperatura ambiente y con agitación constante. Finalmente, los complejos inmunes fueron detectados por la técnica ECL-PLUS (Enhanced Chemiluminescence PLUS



system, Amersham). Antes del revelado se removió el exceso de este último anticuerpo realizando tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

El anticuerpo primario utilizado fue un monoclonal de ratón contra el péptido epítipo derivado de la hemaglutinina del virus de influenza humano (Clon 12CA5; Roche Applied Science) diluido 1:1000 en TBS-T. El anticuerpo secundario usado fue el Anti-Mouse IgG conjugado a Horseradish Peroxidase, Promega®, en una dilución 1:3000 con TBS-T. A modo de control positivo se utilizó la vacuna antigripal AGRIPPAL® S1, que contiene tres cepas de Virus Influenza Humano inactivados, que expresan la proteína hemaglutinina.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó empleando cloroformo libre de fenol. Para comenzar con la extracción del ADN genómico, se tripsinizaron las células, se las centrifugó durante 7 minutos a 1150g y se descartó el sobrenadante. Luego se transfirieron a eppendorfs estériles, se resuspendieron en 200 µL de buffer de digestión y 5 µL de proteinasa K 100 (µg/mL). Se colocaron en baño de agua a 55°C durante 2 horas. Una vez cumplido este tiempo, se agregó acetato de potasio 1 M (60 µL de acetato 5 M), 250 µL de cloroformo, se dejaron reposar durante 30 minutos en hielo y luego se centrifugaron 8 minutos a 13500 g a 4°C. Luego de la centrifugación se separó la fase superior y se colocó en tubos nuevos estériles. Para precipitar el ADN se colocaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se llevó al freezer a -70°C durante 30 minutos. Una vez cumplido este tiempo, se centrifugó 20 minutos, a 13500 g a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 70%, se vortereó y se volvió a centrifugar a 13500 g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente se dejó secar el pellet a temperatura ambiente resuspendiéndose en 50 µL de buffer TE estéril.

PCR de ADN Genómico

Con el fin de corroborar la presencia del transgén en el ADN de las células transfectadas, se realizó una PCR a partir de ADN genómico buscando amplificar la secuencia correspondiente al casete de expresión de ZsGreen1 (CMV+ZsGreen1+polyA). Se utilizaron los cebadores 5'-GATCGGGCCCCTAGTTATTAATAGTAATCA-3'

5'GATCATCGATTGGACAAACCACAACACTAGA- 3'. Las condiciones de la PCR fueron 95°C durante tres minutos para la desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos de amplificación: desnaturalización a 95°C por 30 segundos; hibridación de los cebadores a 63°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 3:30 minutos. En el ciclo de extensión 30 se adicionó un paso de extensión a 72°C durante 10 minutos. El control positivo consistió en vector purificado I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo y para control negativo se empleó agua destilada.

Recolección y selección de los ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron a partir de ovarios provenientes de vacas faenadas en el Frigorífico Rioplatense S.A. situado en General Pacheco (Provincia de Buenos Aires). Los ovarios fueron transportados en una conservadora conteniendo solución fisiológica estéril (0,9 % NaCl) suplementada con 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO, USA), a una temperatura entre 20°C y 25°C. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron acondicionados, eliminándose los restos de cuernos uterinos y/o ligamentos y lavados tres veces con solución fisiológica con antibióticos. Los complejos ovocitos-células del cúmulo (COCs) se recuperaron por punción y aspiración de folículos de 2 a 10 mm de diámetro, en medio de recolección (10 mL Medio TCM-199 con sales de Hanks, 1 mg Heparina, 20 mg BSA, 10 µL gentamicina), utilizando agujas del tipo mariposa de calibre 19G para recolectar su contenido a 50 mmHg (20 mL/min) de presión negativa, con una bomba de vacío por flujo de agua (Tubo Venturi). Una vez finalizada la punción, los tubos conteniendo el fluido folicular se mantuvieron en reposo durante 5 minutos con el propósito de decantar los COCs. Luego se recolectó el *pellet* con pipeta Pasteur y se colocó en una placa de búsqueda. Los ovocitos obtenidos fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica a una magnificación de 30X, conservando aquellos que presentan tres o más capas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo (Figura 9). Los COCs fueron lavados tres veces mediante pasajes a través de gotas de medio de manipulación HEPES-*Synthetic Oviductal Fluid*: H-SOF (20 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, 107.7 mM NaCl, 7.1 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.5 mM MgSO₄, 7.3 mM Piruvato de Na, 0.2 mM L-Glutamina, 1.8 mM Citrato de Na, 1.8 mM CaCl₂ 2H₂O, 5.4 mM Lactato de Na y 3 mg/mL de BSA) en placas de Petri.

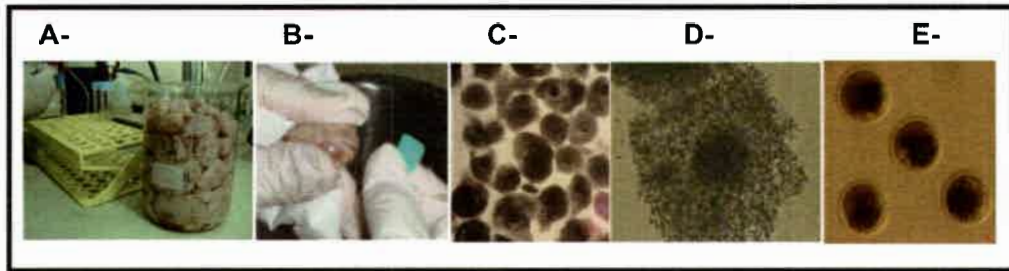


Figura 9. Procesamiento de ovarios bovinos y maduración *in vitro* de ovocitos. (A) Acondicionamiento de ovarios; (B) Aspiración de folículos ováricos; (C) Selección de complejos cúmulo-ovocitarios de excelente calidad (grado 1); (D) Maduración de ovocitos y expansión de células del cúmulo; (E) Ovocito desnudado maduro, evaluado por la presencia del primer cuerpo polar.

Maduración *in vitro* en bovinos

La maduración se realizó en medio base TCM-199 Earle's (31100-035, Gibco, Grand Island, NY, EEUU) compuesto por 0,2 mM de piruvato de sodio, 100 μ M cisteamina, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de gentamicina, 25,1 mM de NaHCO_3 y 10 % de suero fetal bovino inactivado. De ahora en adelante denominado medio base), suplementado con 1 UI rhFSH (Puregón, Organon, Ca, USA). Los COCs seleccionados fueron cultivados en placas de 4 pocillos (Nunc, USA) en grupos de 50 COCs por pocillo conteniendo 500 μ L de medio de maduración a 38.5°C, en una atmósfera de 5 % CO_2 y 99 % de humedad, durante 24h.

Luego de 24 h de iniciada la maduración se evaluó primero de modo indirecto la expansión de las células del cúmulo. Se removieron las células de la granulosa para ver presencia del primer corpúsculo polar (CPI) indicador que refleja que los ovocitos han alcanzado la metafase II de la meiosis (MII, ovocitos maduros). Los COCs fueron colocados durante 4 minutos en una solución de 1 mg/mL de hialuronidasa en H-SOF y se desnudaron por acción mecánica mediante pipeteo enérgico. Los ovocitos maduros se seleccionaron por visualización del CPI, y dependiendo del experimento fueron activados por partenogénesis o se los enucleó y fueron posteriormente empleados para transferencia nuclear.

Maduración in vitro en equinos

Los ovarios se obtuvieron de un grupo de yeguas con desconocida historia reproductiva de un matadero equino situado a 50 km de nuestro laboratorio. Los ovocitos fueron obtenidos por aspiración de los folículos con una aguja de 19 G conectado a una bomba de aspiración y madurados in vitro durante 18 a 22 horas en microgotas de 50 μ L de medio TCM 199- Earle's suplementado con 1 mM-glutamina, 0,19 mM-piruvato de sodio, 5 mg / mL FSH (Bioniche), 100 ng / mL factor de crecimiento epidérmico, 100 ng / mL de factor de crecimiento similar a la insulina factor I, y 10% de suero fetal bovino, bajo aceite mineral. Después de la maduración in vitro, los complejos cumulus- ovocitos se incubaron en una hialuronidasa 0,1% solución durante 10 minutos, y sus células del cumulus fueron eliminadas mediante pipeteo vigoroso a través de una pipeta de vidrio de fino calibre.

Procedimiento de TNCS

Las micropipetas de vidrio para micromanipulación fueron adquiridas a comercialmente (Vitrolife Inc., USA). Se emplearon micropipetas de sostén rectas de diámetro externo de aprox. 180 μ m. Las agujas de enucleación e inyección presentaban un ángulo de 35° y diámetro externo 15-18 μ m. La succión y presión positiva fueron controladas por un sistema de microinyección VARIO oil (Eppendorf, Mu, Germany) y un microinyector de sostén VARIO Air (Eppendorf, Mu, Germany).

Una placa de Petri (Corning o Optilux, Falcon, USA) fue utilizada como soporte para la micromanipulación en el microscopio en la cual se colocaron tres gotas de 200 μ l de medio de manipulación H-SOF, cubriéndose con aceite mineral y precalentando la misma a 38,5°C hasta su utilización,

Enucleación

La enucleación fue llevada a cabo en un microscopio invertido Eclipse 2000S Nikon (TK, Japón) con micromanipuladores hidráulicos NT88 Narishige (TK, Japón). Toda la maniobra fue llevada a cabo a 38,5°C utilizando un sistema de epifluorescencia Nikon, el cual es controlado por un obturador automático Uniblitz (Cop, Dinamarca).

Los cromosomas de aquellos ovocitos maduros (MII, evidenciada por la presencia del CPI) fueron teñidos con una solución de bis-benzimida (H-SOF con 1



mg/mL de Hoechst 33258) y colocados en las gotas de micromanipulación (HEPES-SOF suplementado con 1% SFB) cubiertas por aceite mineral. El citoplasma fue expuesto a la luz UV por no más de 5 seg, para visualizar la posición de los cromosomas en metafase. La enucleación (remoción del material genético del ovocito) se llevó a cabo por micromanipulación, aspirando el genoma visualizado. Los cromosomas y el cuerpo polar fueron removidos con no más del 30 % de citoplasma, la pipeta conteniendo el material genético fue expuesta a luz UV para corroborar la correcta enucleación (Figura 10).

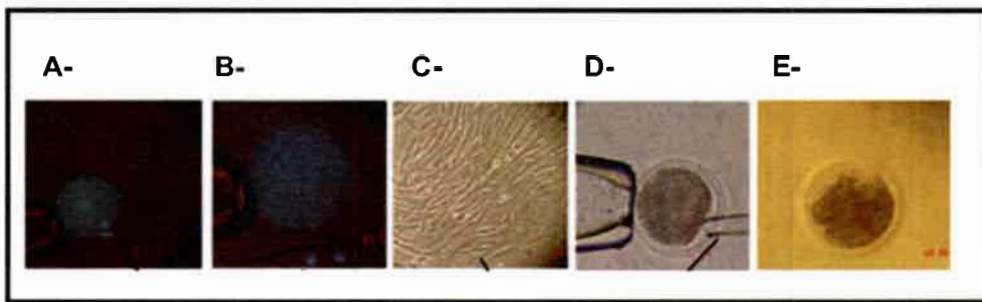


Figura 10. Enucleación del ovocito y transferencia nuclear de células somáticas en especie bovina. (A) Tinción con Hoescht 33342 (bis-benzimida) y visualización del material genético del ovocito; (B) Enucleación: aspiración de la placa metafásica y el cuerpo polar; (C) Fibroblastos donantes; (D) Transferencia del material genético donante en el espacio perivitelino; (E) Fusión de las membranas del citoplasma y la célula donante.

Células donantes para TNCS

Una semana previa al clonado, se descongelaron y se cultivaron a 38,5°C. Cuatro días previos a la maniobra de clonación se las cultivó en medio de sincronización (DMEM suplementado con 0,5 % de SFB y antibióticos), con el fin de que las células permanezcan en estadio G0 y/o G1 (Campbell y col., 1996a; Campbell y col., 1996b). Previo a la transferencia, se levantaron con solución de tripsina al 0,5 % y fueron centrifugadas 2 veces a 200 g durante 5 min. Luego fueron resuspendidas en medio de manipulación H-SOF y colocadas en la gota de transferencia.

Transferencia nuclear de células somáticas

Las células donantes se transfirieron por micromanipulación al espacio perivitelino del ovocito enucleado, utilizando el mismo orificio realizado en la zona pelúcida durante la enucleación. (Figura 10-D).

Fusión

Luego se procedió a realizar la fusión de la célula donante con el citoplasma del ovocito, para ello se colocaron en una cámara de fusión de 0,5mm de luz entre dos electrodos de platino. Una vez alineados, se aplicó un pulso de 1,8 kV/cm² por 25 μ s, en un fusor de onda cuadrada BTX Electrocell 830 (Harvard Apparatus, Mas, USA). Los ovocitos fueron colocados en medio de manipulación y se verificó la fusión 20 min luego del pulso. Los pares célula-ovocito no fusionados se sometieron a re-fusión repitiendo los pasos antes mencionados.

Activación química

Una hora después, los ovocitos fusionados fueron activados en medio H-SOF con 5 μ M de ionomicina durante 4 minutos. Luego se lavaron en medio H-SOF y se transfirieron a gotas de activación bajo aceite mineral conteniendo 1,9 mM de 6-DMAP (6-dimetilaminopurina) en medio de cultivo embrionario CSC (del inglés, *Continuous Single Culture*) (Irvine Scientific, USA) suplementado con 8 mg/mL de BSA. La activación se llevó a 38,5°C, 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂ y 99 % de humedad durante 4 horas.

Cultivo embrionario

Transcurrido el tiempo de cultivo con 6-DMAP, los embriones producidos por TNCS e ICSI fueron lavados con medio fresco de cultivo y mantenidos en grupos de 20, en 400 μ L de medio CSC suplementado con 8mg/mL de BSA por pocillo y cubiertos con 400 μ L de aceite mineral a 38,5°C, 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂ y 99 % de humedad, durante 8 días hasta la formación de blastocistos.

Evaluación de la expresión de la proteína verde fluorescente

Para evaluar la expresión de la proteína ZsGreen1, los embriones producidos *in vitro* por TNCS e ICSI fueron brevemente observados en luz blanca y luz ultravioleta con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó el filtro de excitación de 488nm y un filtro de emisión de 530nm (luz azul). Las observaciones se realizaron los días 4, 6, y 8 post activación. Se calcularon las tasas de embriones que expresan ZsGreen1 según el tratamiento correspondiente para los experimentos 2, 3, 4 y 5.

Procesamiento del semen y capacitación espermática

En los experimentos se utilizó semen de toros raza Brangus en pajuelas comerciales congeladas, conteniendo dosis de 0.5mL, con capacidad fecundante *in vitro* probada. Las pajuelas de semen fueron descongeladas primero 10 seg en aire, y luego introduciéndolas en un baño térmico a 37°C durante 30 seg. Los espermatozoides móviles se seleccionaron por columna de miniPercoll® de densidad creciente (45% y 90 % v/v).

El semen se colocó en la parte superior de la columna y se centrifugó a 600 g durante 20 min, al finalizar este paso, se retiró el sobrenadante del tubo (diluyente, células muertas, etc.), y se tomó el *pellet* del fondo, que contiene los espermatozoides móviles, los que fueron lavados en medio de capacitación H-TALP (Tyrode, albúmina, lactato, piruvato: 114 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 0,4 mM NaH₂PO₄.H₂O, 10 mM lactato de sodio (60%), 25 mM NaHCO₃, 1,4 mM cafeína, 2 mM CaCl₂ 2H₂O, 0,5 mM MgCl₂.6H₂O y 10 mM HEPES) y centrifugados a 200 g por 5 min. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 500 µL de medio de capacitación H-TALP.

El semen equino para ICSI fue tratado de manera similar al semen bovino.

Mezcla de digestión de I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo con enzimas de restricción

La reacción de restricción del plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en cada caso para los experimentos 3 y 4, se llevó a cabo de acuerdo a instrucciones del fabricante. La enzima I-SceI (NEB, USA) se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso (Rembold y col., 2006). Brevemente, la mezcla consistió en 1X NEBuffer I-SceI, plásmido 500ng/ µL, 0,5U/µL de I-SceI y agua hasta alcanzar un volumen final de 20 µL y una concentración final de transgén 50ng/ µL. La mezcla de digestión se mantuvo 1 hora a 37°C. Luego de la digestión, se inactivó la enzima calentando a 65°C durante

20 minutos. La enzima BssHII (NEB, USA) se almacenó a -20°C . La mezcla consistió en 1X NEBuffer 3, plásmido $500\text{ng}/\mu\text{L}$ $0,5\text{U}/\mu\text{L}$ de BssHII y agua hasta alcanzar un volumen final de $20\mu\text{L}$ y una concentración final de transgén $50\text{ng}/\mu\text{L}$. La mezcla de digestión se mantuvo 16 horas a 50°C . Luego de la digestión, se inactivó la enzima calentando a 80°C durante 20 minutos. En cada caso, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% para verificar la correcta digestión del plásmido en cuestión.

Coincubación de espermatozoides con ADN exógeno

Luego de la separación mediante columna de miniPercoll®, $3\mu\text{L}$ de suspensión de espermatozoides resuspendidos en H-TALP fueron incubados durante 5 minutos en hielo con $0,5\mu\text{g}$ del plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en su conformación CCC que presenta sitios de restricción tanto para la meganucleasa I-SceI como para la endonucleasa BssHII (figura 6). En los experimentos 4 y 5, también se coincubaron espermatozoides ya sea con el plásmido junto con la enzima de restricción o con la mezcla de digestión del plásmido, según se especifica arriba.

Procedimiento de ICSI

La inyección de espermatozoides fue llevada a cabo en el microscopio invertido. La succión y presión positiva fueron controladas con un sistema jeringa de 10 mL (Terumo, AR) para la inyección del espermatozoide. Una placa de Petri (Corning, EE.UU) fue utilizada como soporte para la micromanipulación en el microscopio. En dicha placa se colocaron tres gotas de $200\mu\text{l}$ de medio de manipulación H-199, cubriéndose con aceite mineral y precalentando la misma a $38,5^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

La figura 11 muestra el procedimiento de ICSI. Aquellos espermatozoides con morfología normal fueron seleccionados a partir de una suspensión conteniendo citrato de sodio en 10% polivinilpirrolidona (PVP, 99219). Cada espermatozoide fue inmovilizado y aspirado con una micropipeta de inyección de $9\mu\text{m}$ de diámetro. La micropipeta de inyección se hizo pasar a través de una gota de H-TALP para eliminar cualquier espermatozoide pegado, y luego se transfirió a la gota conteniendo los ovocitos en MII. Los ovocitos se sostuvieron mediante presión negativa con una micropipeta de sujeción (MPH-XLG-35, Origio, USA) con el corpúsculo polar en la

posición de las 6 h de las agujas del reloj. La micropipeta de inyección se introdujo a través de la zona pelúcida y dentro del citoplasma en la posición de las 3 en punto. Mediante aspiración, se procedió a la ruptura del oolema y tanto el espermatozoide como el citoplasma aspirados fueron depositados en el interior del ovocito.

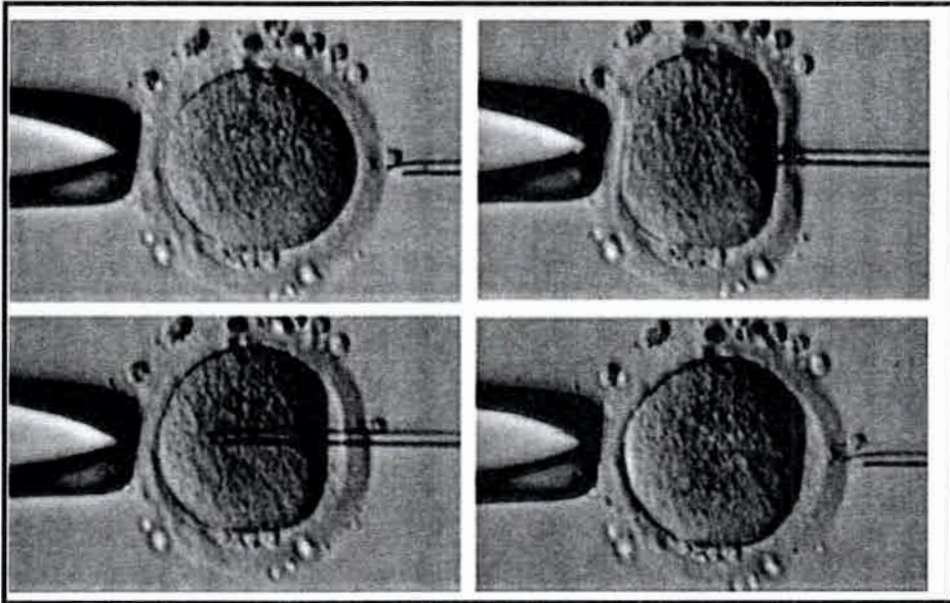


Figura 11. Secuencia fotográfica del procedimiento de Inyección intracitoplasmática de espermatozoides ICSI. Se observa la inyección de un único espermatozoide en el interior de un ovocito maduro desnudo, con el corpúsculo polar ubicado en posición 6 de las agujas del reloj. La micropipeta de inyección se introdujo a través de la zona pelúcida y dentro del citoplasma en la posición de las 3 en punto.

Activación química de ovocitos post- ICSI

Posteriormente a la inyección del espermatozoide, los ovocitos fueron activados en una placa conteniendo 5 μ M de I_o en H-SOF durante 4 min, inmediatamente se colocaron en medio CSC por 3 horas para permitir la extrusión del segundo corpúsculo polar. Luego los ovocitos se colocaron en 1,9 mM de 6-Dimentilaminopurina (6-DMAP) diluido en medio CSC durante 4 h. Los inhibidores se eliminaron mediante tres lavados en medio de manipulación H-SOF y el cultivo prosiguió en medio CSC como se describió anteriormente. A modo de control de

activación, una muestra representativa de los ovocitos sin inyectar fue activada partenogénicamente y colocada en cultivo embrionario.

Sexado de embriones mediante diagnóstico genético preimplantacional con líquido blastocélico

En la tapa de una placa de petri mediana (60 mm) para micromanipulación se armaron gotas de 50 μ L cada una de medio de manipulación dispuestas en una fila vertical y una gota accesoria de 2 μ L para colocar el líquido blastocélico. Se cubrieron las gotas con aceite mineral y se mantuvo la tapa a temperatura ambiente hasta el momento de comenzar la biopsia. Se colocó una aguja de biopsia del lado izquierdo del micromanipulador y una micropipeta de sujeción (MPH-XLG-35, Origio) del lado derecho (Figura 12-A,B).

Para realizar la aspiración del líquido blastocélico se sostuvo al embrión generado por ICSI-SMGT con la micropipeta de sujeción dejando el maciso celular interno (MCI) a las 6h (opuesto a la dirección del bisel de la aguja de aspiración). Se perforó el embrión y se llevó la punta de la aguja al centro de la cavidad blastocélica. Se aspiró el blastocele hasta observar que el embrión comenzaba a colapsarse. Una vez que el embrión estuvo completamente colapsado, se lo desacopló de la micropipeta de sujeción, y se transfirió a la gota de 2 μ L todo el líquido blastocélico aspirado (Figura 12-C).

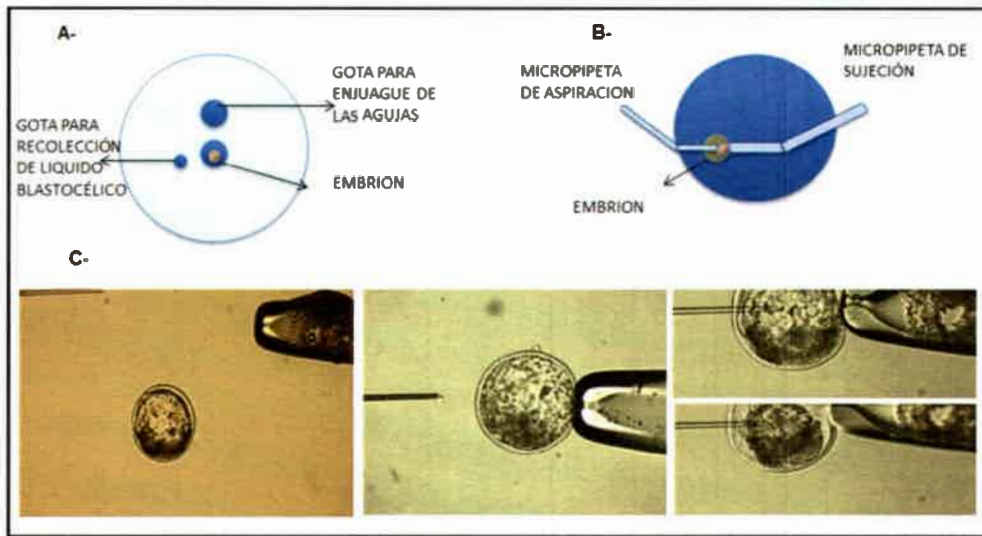


Figura 12. Sexado de embriones mediante diagnóstico genético preimplantacional con líquido blastocélico. (A) Armado de Placa de Biopsia; (B) Disposición de las micropipetas de vidrio de aspiración y de sujeción; (C) Se muestra un blastocisto bovino producido por ICSI-SMGT con el maciso celular interno (MCI) en sentido opuesto a la dirección del bisel de la aguja de aspiración. Se perforó el embrión y se llevó la punta de la aguja al centro de la cavidad blastocélica. Se aspiró el blastocele hasta observar que el embrión comenzaba a colapsarse.

Colocamos 2 μL de agua libre de nucleasas en un eppendorf de 0,2 mL, uno para cada biopsia. Las muestras fueron conservadas en el freezer o se emplearon directamente para la PCR. Se utilizó la enzima *GoTaq Green Master Mix* (Promega) y los ensayos se realizaron sobre restos de embrión y sobre líquido blastocélico libre de células con 12,5 μL de volumen total por amplificación, conteniendo 6,25 μL de 2X-*GoTaq Green Master Mix* (Promega), con 1 μM de cada oligonucleótido. Se emplearon 4,45 μL de molde para cada reacción de amplificación. El protocolo completo involucra dos rondas de PCR consecutivas. El programa para la PCR1 fue desnaturalización inicial 95°C por 1 minuto, luego 95°C 45 segundos, seguido de 60 °C 45 segundos para el apareamiento de los cebadores. La fase de extensión fue 72°C a 45 segundos y finalmente 72°C 10 minutos. El programa para PCR 2 fue igual, excepto por la temperatura de alineamiento de los cebadores que fue de 64°C. La primera PCR1 se realiza con los cebadores externos de TSPY y GAPDH: Ext-TSPY-F 5'-CCCGCACCTTCCAAGTTGTG-3' y Ext-TSPY-R 5'-TGCTCCTCCACCGTCTTCT-3, GAPDH-PGD-F 5'-AAGGCCATCACCATCTTCCA-3' y GAPDH-PGD-R 5'-

CCACTACATACTCAGCACCAG-3'. La segunda PCR es igual pero con cebadores internos de TSPY más GAPDH: Int-TSPY-F 5'-TTGTCACCAGCAGTTGTCACG-3', Int-TSPY-R 5'-AACCTCCACCTCCTCCACGATG-3' más GAPDH-PGD-F (5' – AAGGCCATCACCATCTTCCA-3') y GAPDH-PGD-R (5'-CCACTACATACTCAGCACCAG-3') y como ADN se usan 4,25 ul de la primera reacción de amplificación.

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron con el programa GraphPad PRISM® Software Estadístico. El desarrollo embrionario y la expresión del transgén ZsGreen1 se compararon mediante el test exacto de Fisher. Se utilizó el análisis estadístico llamado “análisis de la varianza” (ANOVA) de un factor. Se consideraron diferencias significativas con un $p < 0,05$. Cada vez que el ANOVA arrojó un resultado significativo, se aplicó el test de Tukey para comparar las medias de los diferentes tratamientos.

Capítulo I

RESULTADOS

Resultados

ETAPA 1: Desarrollar una estrategia para manipular genéticamente células somáticas en cultivo primario empleando enzimas de restricción, orientado a la producción futura de animales transgénicos mediante la técnica de transferencia nuclear.

Verificación de la funcionalidad in vitro del vector de expresión

Con el objetivo de generar embriones bovinos transgénicos empleando enzimas de restricción, realizamos la construcción I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo (6113pb) que contiene las secuencias codificantes para la proteína fluorescente verde (ZsGreen1) y el gen de la neomicina fosfotransferasa (Neo^r). Ambos genes fueron clonados a partir del vector comercial pZsGreen1-N1 dentro del SMC del vector receptor I-SceI-pBSII-SK+ (flanqueado por dos sitios de reconocimiento de la meganucleasa I-SceI). Se realizó el análisis de restricción del plásmido recombinante I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo, digiriendo con las endonucleasas Eco0109I y ClaI para liberar el fragmento de 1612pb correspondiente a la secuencia codificante del gen ZsGreen1. Adicionalmente se digirió al vector con EcoRV y SpeI para liberar el fragmento de 1400pb de la secuencia del gen Neo^r (Figura 13). El plásmido final fue secuenciado por la compañía Macrogen (Corea) para confirmar su identidad. Para asegurarnos la funcionalidad del vector, verificamos su expresión transfectando FFB en cultivo (Figura 14-B).

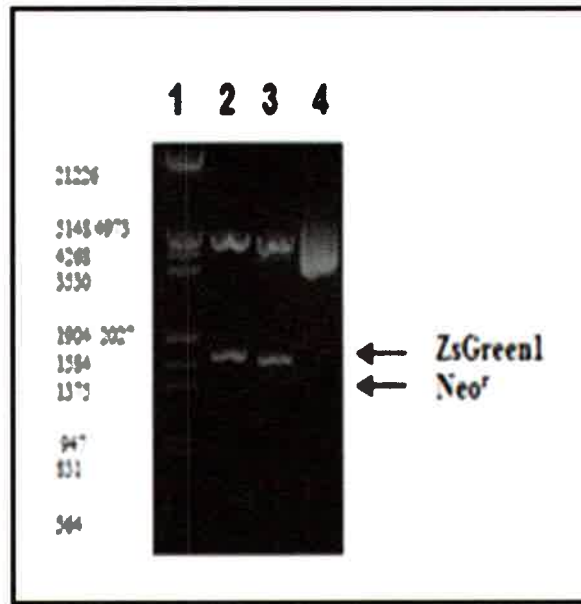


Figura 13. Análisis de restricción del plásmido recombinante I-SceI-pBSII-SK+ ZsGreen1+Neo. Calle 1: Marcador de Peso molecular (Fago λ digerido con EcoRI y Hind III); Calle 2: Plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo digerido con Eco0109I y ClaI liberando el fragmento de 1612pb correspondiente a la secuencia codificante del gen ZsGreen1; Calle 3: Plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo digerido con EcoRV y SpeI, para liberar el fragmento de 1400pb de la secuencia del gen Neo; Calle 4: Plásmido recombinante I-SceI-pBSII-SK+ ZsGreen1+Neo sin digerir, circular covalente y cerrado (6113pb).

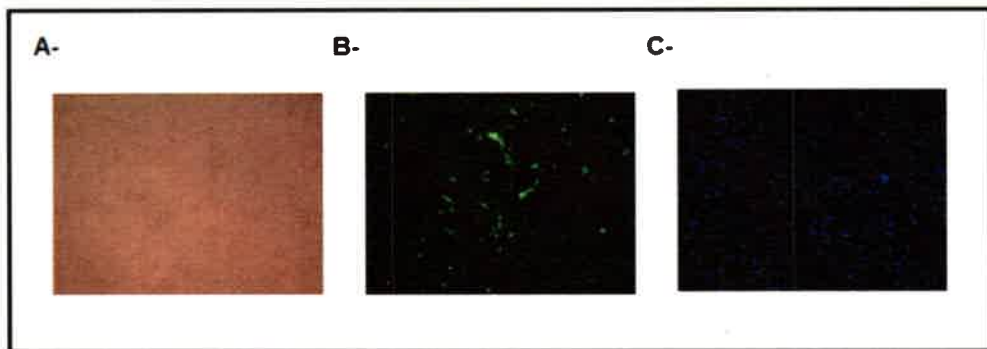


Figura 14. Microfotografías de fibroblastos fetales bovinos (A) FFB observados a campo claro. Las células presentan su forma fusiforme característica; **(B)**Microfotografía con luz azul del cultivo de FFB tratado con una relación 2,5:1 Lipofectamina/ADN plasmídico a las 48 hs post-transfección; **(C)**Núcleos de FFB teñidos con Hoechst observados al UV en microscopio de fluorescencia para descartar presencia de micoplasmas en los cultivos celulares.

Se establecieron varias líneas celulares a partir del cultivo primario de explantos de fetos bovinos provenientes de animales de faena. Periódicamente se realizaron tinciones directas de ADN con el colorante bisbenzimidazoles para evaluar las características morfológicas nucleares y controlar la ausencia de contaminación por micoplasmas (Figura 14-B, C). Se observaron poblaciones celulares heterogéneas de diversas morfologías:

Forma fibroblástica o tipo-fibroblasto (*Fibroblast like cell*), células grandes, planas, presentan forma alargada (en forma de huso) y poseen elongaciones que se extienden hacia fuera de los extremos del cuerpo celular. El núcleo celular es plano y oval.

Forma tipo epitelial-endotelial. (*Epithelial-like cells*) son células con forma poligonal, de dimensiones más bien regulares y crecen adheridas a la placa de cultivo en parches discretos. También se evidenciaron células de forma redonda.

El plásmido vector para expresión de la meganucleasa en eucariotas pCBASce, contiene las secuencias que codifican para la expresión de la I-SceI modificada de 276 aminoácidos fusionada a una etiqueta de epítipo de hemaglutinina (hemaglutinin tag) para su detección mediante *Western blot* (WB). En nuestro laboratorio, generamos la construcción plasmídica control pCBA derivada del vector de expresión pCBASce, la cual carece del sitio codificante de I-SceI y del epítipo de hemaglutinina (Figura 15).

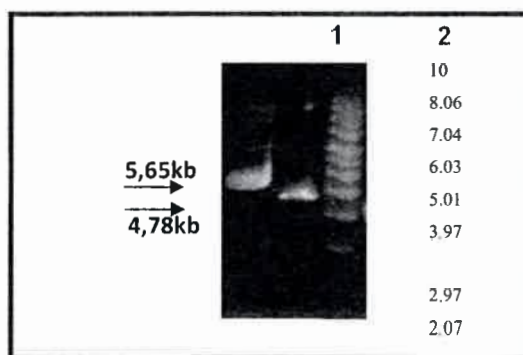


Figura 15. Plásmido control pCBA Calle 1: pCBASce 5.65 kb; Calle 2: pCBA 4,78 kb producto de la digestión de pCBASce con EcoRI y ligación del mismo; Calle 3: Marcador de peso molecular (PM).

EXPERIMENTO 1: Establecimiento de líneas de células somáticas modificadas genéticamente empleando un sistema mediado por la meganucleasa I-SceI.

Se realizó la transfección de FFB con el objetivo de establecer una metodología transgénica basada en la presencia simultánea de la meganucleasa I-SceI y un transgén (flanqueado por sitios de restricción para la misma enzima) en el interior celular. El análisis de fluorescencia por citometría de flujo a las 72 horas post-transfección no mostró diferencias estadísticas entre la tasas de transfección de células fluorescentes co-transfectadas con los vectores pCBASce (T2) o con el plásmido control pCBA (T3) ($p > 0,05$). La intensidad de la emisión fluorescente (indica el nivel de expresión de la proteína trazadora ZsGreen1) fue similar en los tratamientos 2 y 3.

En las líneas celulares en las que se obtuvo altas tasas de transfección con el vector I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo, se determinó la expresión de la meganucleasa I-SceI, producida a partir del plásmido pCBASce por la técnica de WB. Este último plásmido no confiere resistencia a ningún antibiótico, se expresa de forma episomal, por lo cual, las células se procesaron pasadas 72hs de la co-transfección. El plásmido pCBA fue empleado como control en estos experimentos. Se utilizó una vacuna antrigripal AGRIPPAL® S1 para la puesta a punto del ensayo. Se sembraron concentraciones decrecientes de vacuna en un gel de Poliacrilamida. La vacuna contiene tres cepas inactivadas del virus de la influenza humana que expresan el antígeno hemaglutinina, detectado por el anticuerpo anti-HA. En la figura 16-A se puede observar claramente el patrón de las tres bandas. En la figura 16-B se muestra la banda esperada de 31kDa en aquellos FFB del tratamiento 2, co-transfectados con pCBASce.

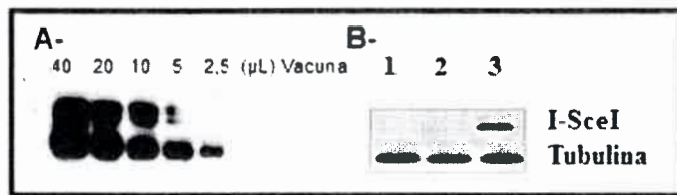


Figura 16. Expresión temporal de la meganucleasa I-SceI. (A) La Vacuna AGRIPPAL® S1 utilizada como control positivo. El anticuerpo anti- HA revela antígenos purificados de hemaglutinina presentes en la superficie de tres cepas tipo A y B del virus de la influenza;(B) Calles 1: Lisado de proteínas de células no transfectadas; calle 2 lisado de proteínas de FFB co-transfectados con pCBA + I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo; calle 3 FFB co-transfectados con pCBASce + I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo.

Electroforesis alcalina en células individuales (Ensayo Cometa)

Se realizó el ensayo cometa (momento de la cola, del inglés *tail moment*) a fines de evaluar la posible aparición de cortes en las cadenas de ADN en las células transgénicas de los tratamientos 1, 2 y 3 pasadas 72 h de la transfección (Figura 17). Se analizaron cien células por tratamiento, y se determinó que no hay diferencias estadísticamente significativas mediante ANOVA ($p > 0,05$) en el daño al ADN de aquellas células que expresan transitoriamente la meganucleasa I-SceI y las células que no la expresan (Figura 18).

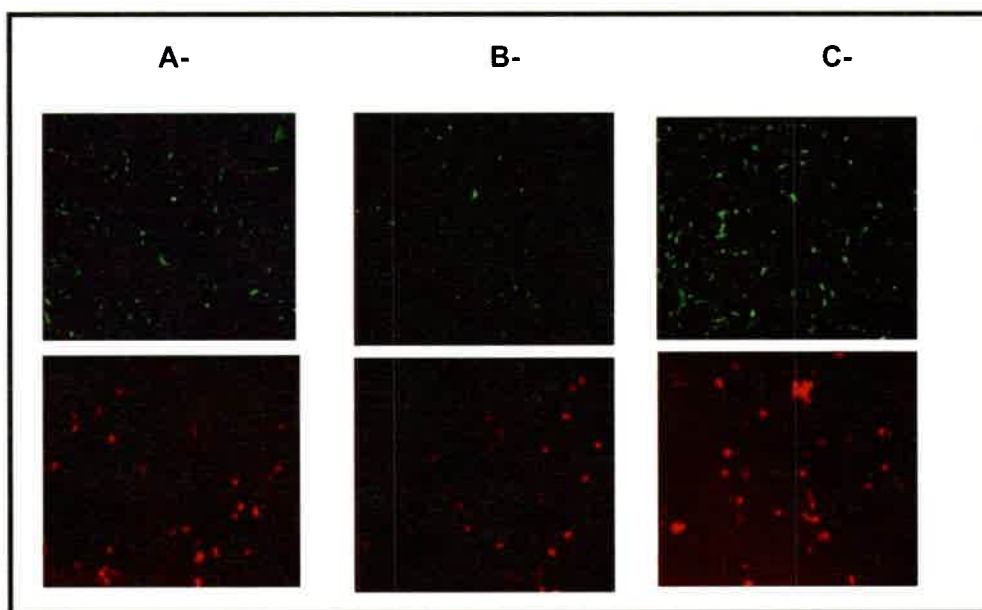


Figura 17. Electroforesis alcalina en células individuales. Arriba. Fotografías de fluorescencia de fibroblastos transgénicos 72 h post transfección con los plásmidos (A)I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo;(B)Cotransfección plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo junto a pCBASce;(C)vectores I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo más pCBA. Abajo, Fotografías de las células tratadas en el ensayo ADN cometa, las imágenes se corresponden con los tratamientos indicados arriba.



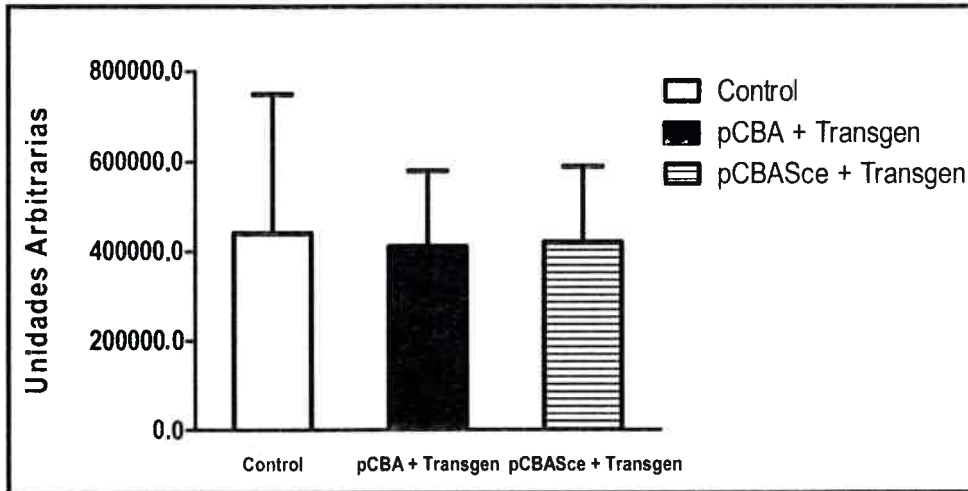


Figura 18. Ensayo cometa. Daño al ADN de células que expresan la meganucleasa y células que no la expresan 72 h después de la transfección. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control. UA: Unidades Arbitrarias, ANOVA ($p > 0,05$).

Determinación de la tasa de transfección estable

Luego de los 21 días de selección positiva con el agregado del antibiótico neomicina se formaron colonias celulares claramente definidas (uniformes y compactas) (Figura 19); colonias laxas (desintegradas), y se observó también la presencia de células incapaces de formar colonias. En los tratamientos 2 y 3 (T2 y T3), se evaluó la tasa de transfección estable que se corresponde a la proporción de células que han integrado establemente y expresan el transgén. Se observó un aumento en la eficiencia de transfección estable de los FFB haciendo uso de enzimas de restricción (T2). La figura 20 muestra el número de colonias de células fluorescentes (CCF) desarrolladas. En los cultivos celulares co-transfectados con relación 1:1 de I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo + pCBASce (T2-1:1), el número de CCF aumentó 6,4 veces respecto del grupo control (T3-1:1) cuando se utilizó la misma relación entre los plásmidos ($8,00 \pm 2,16$ vs $1,25 \pm 0,62$ colonias; $p = 0,02$). Sin embargo, no se encontró diferencia en el número de CCF formadas entre el tratamiento T2-1:3 ($3,75 \pm 1,03$ colonias) y el T3-1:3 control ($2,70 \pm 1,35$ colonias; $p > 0,05$) luego de la co-transfección trabajando con una relación 1:3 entre los plásmidos. La transgénesis mediada por la meganucleasa I-SceI aumenta significativamente la integración de ADN exógeno en FFB en cultivo.

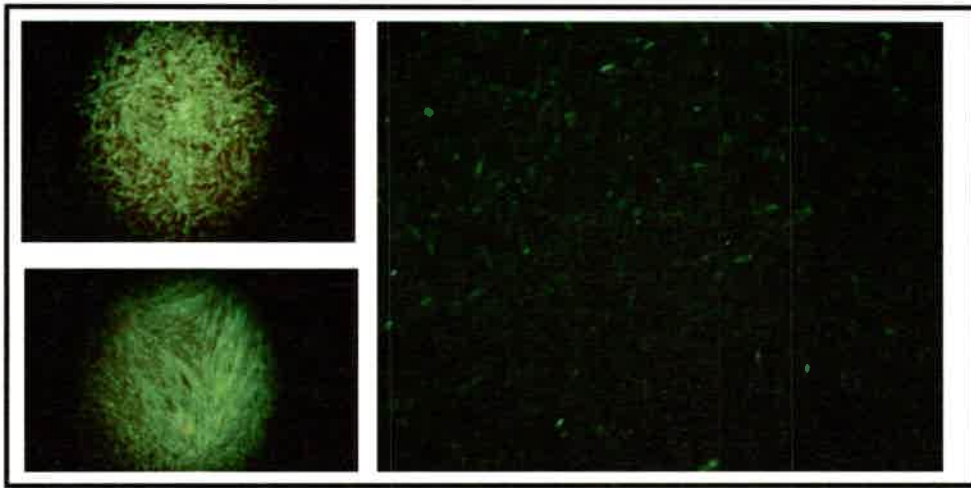


Figura 19. Líneas de células transgénicas verdes fluorescentes obtenidas luego de 21 días de selección con G418 con morfología tipo- fibroblasto.

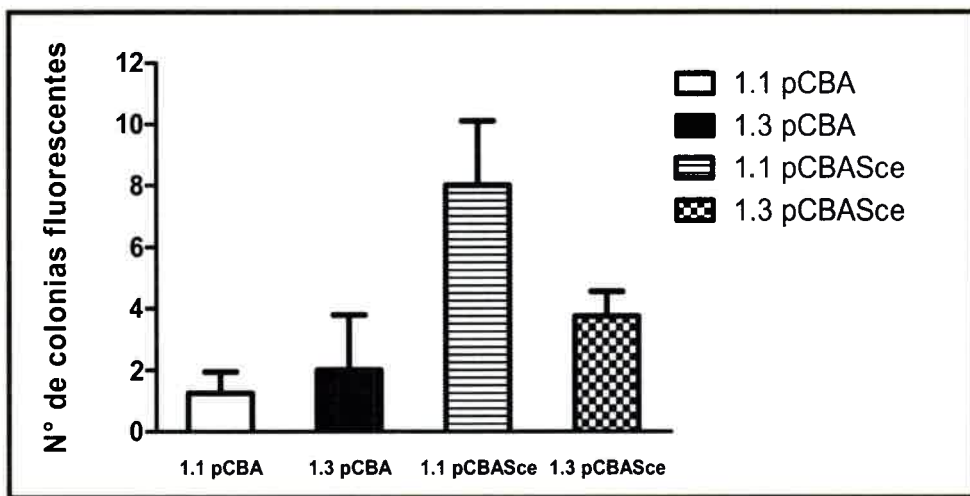


Figura 20. Número de colonias de células fluorescentes obtenidas a los 21 días post co-transfección empleando enzimas de restricción. Co-transfección en relación 1:1 o 1:3 de los plásmidos I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo más los plásmidos pCBASce o pCBA según corresponda.

Se observaron diferencias en las tasas de crecimiento de las diferentes CCF del tratamiento 2. Aquellas con tasa de crecimiento lenta, generalmente frenaban su crecimiento a los pocos días. Por otro lado, las células que proliferaban más rápidamente cambiaban su morfología característica de tipo-fibroblasto, pero conservado la intensidad de fluorescencia. Los signos de deterioro de las CCF luego de

la selección positiva (T2), incluyen núcleos picnóticos, granularidad alrededor del núcleo, citoplasma disperso, forma redondeada, vacuolización citoplásmica y desprendimiento de las células de la placa. Estas características pueden ser causadas por una variedad de razones, incluyendo la senescencia de la línea celular, o la presencia de sustancias tóxicas en el medio (Figura 21).

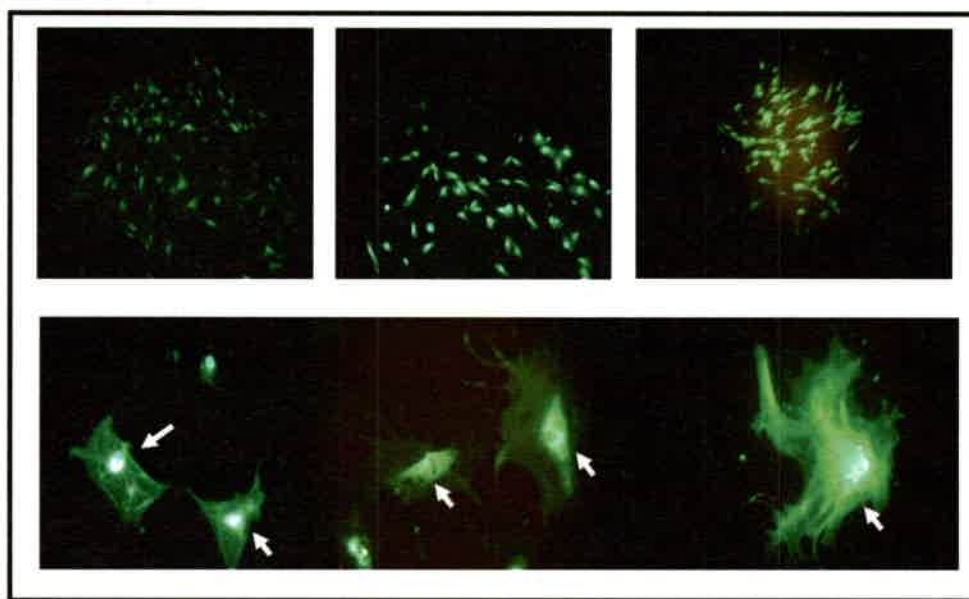


Figura 21. Colonias de Fibroblastos fetales bovinos fluorescentes transgénicos con pérdida de morfología característica. (Arriba). Comienzo de formación de colonias de células fluorescentes resistentes al antibiótico G418;(Abajo). Células con pérdida de morfología típica de los fibroblastos, incapaces de formar colonias. Las flechas blancas indican los núcleos picnóticos y granularidad alrededor del núcleo

Determinación de la presencia del transgén al ADN genómico

Las CCF derivadas del tratamiento 2 resistentes al antibiótico G418, fueron aisladas mediante sub-cultivo en placas individuales y se generaron de ésta manera líneas transgénicas estables fenotípicamente positivas para la expresión de la proteína fluorescente verde detectada bajo luz UV. El ADN genómico de estas líneas fue utilizado como molde en reacciones de PCR para asegurar la presencia del gen ZsGreen1 en las células (ver Figura 22). Se demostró la presencia del transgén por PCR convencional.

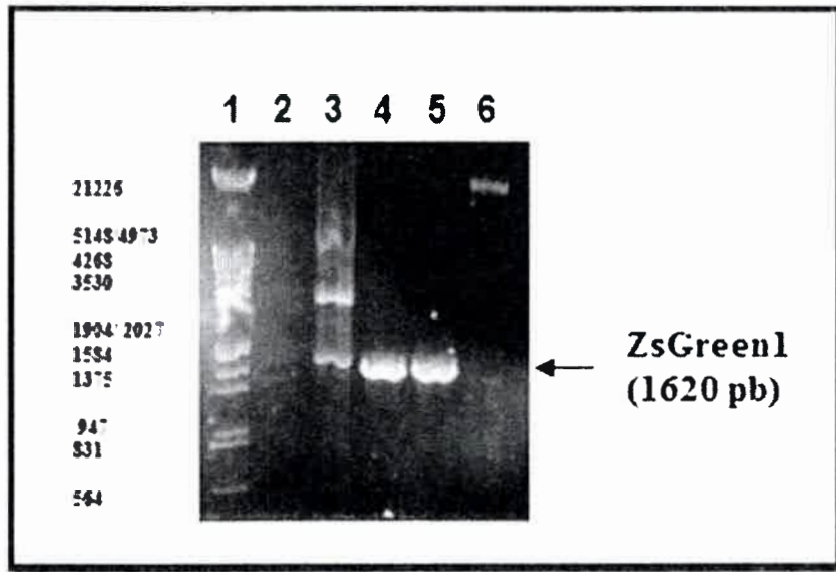


Figura 22. Detección por PCR del casete para la expresión del gen ZsGreen1 a partir del ADN genómico de dos líneas clonales transgénicas derivadas del tratamiento 2. Calle 1: Marcador de peso molecular (Fago λ digerido con EcoRI y Hind III); Calle 2: PCR sin ADN molde, para descartar posible contaminación en la reacción de PCR; Calle 3: Vector purificado I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo; Calles 4 y 5: ADN de células co-transfectadas. Calle 6: ADN genómico de fibroblastos no transfectados.

EXPERIMENTO 2: Generación de una línea celular bovina que produzca de manera constitutiva la meganucleasa I-SceI.

Se transfectaron FFB con el plásmido pNG26i en sus dos formas: circular covalente cerrado (CCC) y linearizado por digestión previa con la enzima de restricción SpeI, con el objetivo de generar líneas celulares bovinas que produzcan de manera constitutiva la meganucleasa I-SceI. Se generaron en total 169 colonias de células resistentes al antibiótico higromicina a los 21 días post selección, desarrolladas a partir de los cultivos celulares transfectados con el plásmido pNG26i.

No se encontró diferencia en el número de colonias formadas entre la forma circular ($14,00 \pm 4.60$ colonias) y el plásmido linearizado ($14,16 \pm 3,06$ colonias) luego de la transfección ($p > 0,05$) (Figura 23). Estas líneas celulares serán muy útiles como modelo para estudiar la integración al genoma celular de secuencias de ADN heterólogo en presencia de una enzima de restricción de baja frecuencia de corte, tal es el caso de la meganucleasa I-SceI (Figura 24).

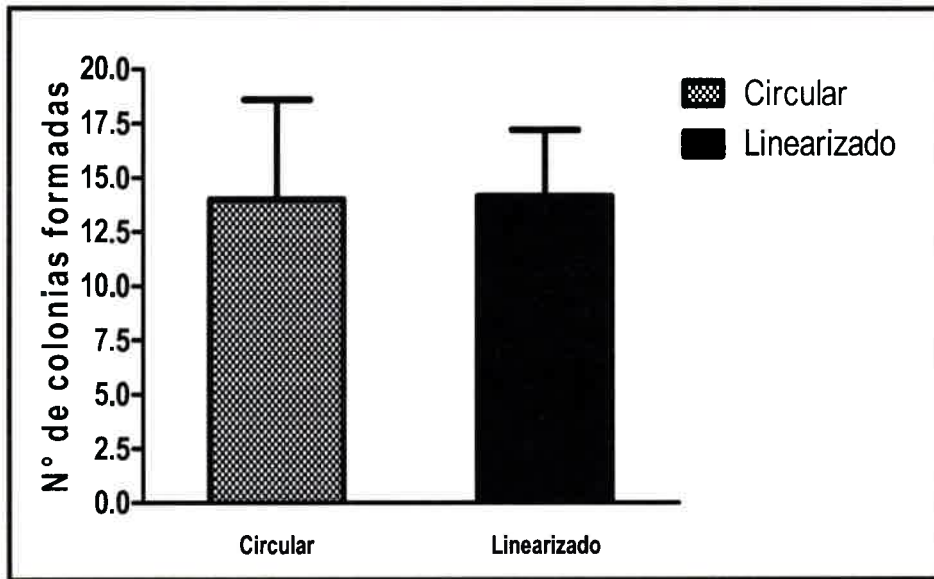


Figura 23. Número de colonias de células que expresan constitutivamente la meganucleasa. Colonias obtenidas resistentes al antibiótico higromicina. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el número de colonias formadas cuando se transfectaron FFB con el plásmido pNG26i en su forma circular respecto al plásmido linearizado ($p>0,05$).

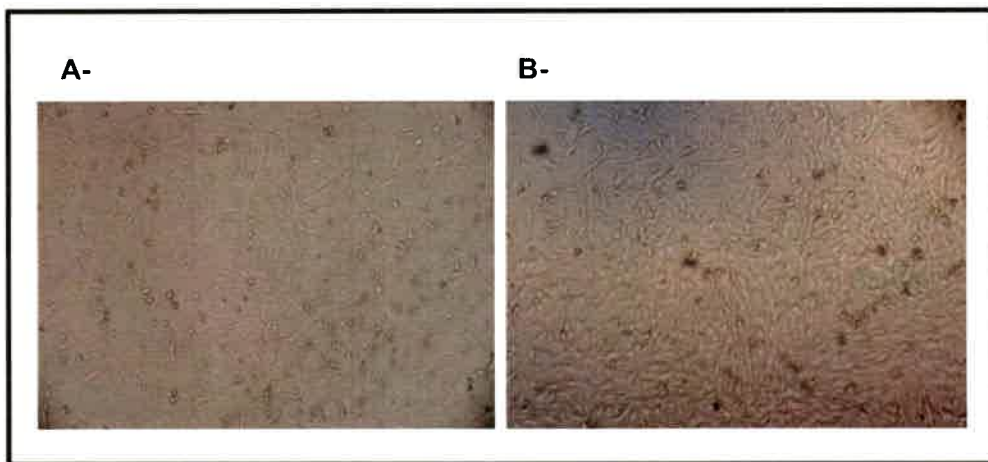


Figura 24. Fibroblastos fetales bovinos obtenidos por transfección empleando el plásmido pNG26i. Fotografía de formación de colonias celulares a los (A) 15; y (B) 21 días post transfección.

ETAPA 2: Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas (clonación).

Obtención de ovocitos

Para el presente trabajo se aspiraron 2956 folículos, de tamaños que oscilaron entre 2mm y 10mm y se seleccionaron únicamente aquellos ovocitos con citoplasma homogéneo y que poseían tres o más capas de células del cúmulo, calidad 1, según manual de la IETS, (del inglés, *International Embryo Transfer Society*). Se probaron dos métodos de recolección folicular por punción de ovarios. Utilizando agujas del tipo mariposa de calibre 19G, recolectando el contenido folicular a 50 mmHg (20 ml/min) de presión negativa, con una bomba de vacío por flujo de agua (Tubo Venturi) o por aspiración manual con agujas calibre 19G acoplada directamente a jeringa, obteniendo mayores índices de recolección y mejor calidad de COCs con aguja y jeringa.

La tasa de recuperación ovocitaria de esos folículos fue del 72% (2127 ovocitos), siendo este el promedio de los índices de cada maniobra. Al principio, las tasas de recuperación fueron menores, pero con las prácticas, se logró incrementar y mantener constante un índice alto de recuperación.

Maduración in vitro

Luego de establecer valores de MIV del 86.33%, continuamos con el proceso de producción de embriones. Ovocitos madurados con este protocolo se usaron para la producción de embriones por partenogénesis, TNCS, FIV e ICSI. Los resultados de maduración se presentan en la tabla IV.

Tabla IV. Maduración in vitro de ovocitos

Sesiones de MIV	Ovocitos (n)	Ovocitos MII CP+ (%)	Ovocitos no maduros CP- (%)	% de Eficiencia de Maduración
3	183	158 (86,33)	25 (13,67)	(86,33)

Activación Partenogenética

En nuestra primera etapa experimental se realizó la puesta a punto de activación asistida de ovocitos mediante métodos físicos y químicos. La activación artificial de ovocitos es un procedimiento clave para el desarrollo exitoso de técnicas como TNCS e ICSI. Se evaluaron distintos protocolos de activación eléctrica que derivaron en tasas de desarrollo embrionario muy bajas (datos no mostrados), por lo cual se decidió finalmente optar por realizar activación con Ionomicina seguido por tratamiento con 6-DMAP. Observamos 46,03 % de tasa de desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto generados mediante activación por métodos químicos, por lo cual decidimos emplear este protocolo para nuestros experimentos de TNCS e ICSI en bovinos.

EXPERIMENTO 3: Producción de embriones transgénicos por transferencia nuclear de células somáticas.

Transferencia nuclear, fusión y activación

Se maduraron *in vitro* 600 COCs por 18 horas. Luego fueron desnudados con 1 mg/ml de hialuronidasa en medio H-SOF y posteriormente teñidos con Hoechst 33342 (bis-benzimida) en medio H-SOF para ser enucleados, este proceso se realizó por aspiración de la placa metafásica y el cuerpo polar. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento empleando grupos de 50 ovocitos cada vez. La eficiencia global de la enucleación fue del 91,4%, y luego de 15 minutos en cultivo, los citoplastos fueron vistos al microscopio bajo el cual se les transfirió el carioplasto al espacio perivitelino, entrando por la cicatriz producida en la maniobra anterior. La eficiencia de transferencia fue del 95,5% en promedio para el tratamiento 1. Las células modificadas genéticamente empleando enzimas de restricción presentaban mayor tamaño respecto de las células control, por lo cual la eficiencia de transferencia en el tratamiento 2 fue menor dado el diámetro interno de las pipetas empleadas para TNCS. Todas las células donantes fueron sincronizadas en G0 y/o G1 del ciclo celular cultivándolas durante 4 días previos a cada sesión con el medio de sincronización y el antibiótico de selección. Esta sincronización induce que la mayoría de las células donantes en cultivo posean, al momento de la transferencia, una copia de su genoma. Finalizada la micromanipulación

de los ovocitos transferidos, se procedió a fusionar las membranas del citoplasto y la célula donante. Para ello se colocaron en las diferentes concentraciones del medio de fusión grupos de 5 a 7 ovocitos alineados y se les aplicaron dos pulsos de corriente continua. Las eficiencias en las fusiones fueron variables, independientemente de la técnica.

En la tabla V se detalla el desarrollo *in vitro* y expresión del gen ZsGreen1 en embriones bovinos generados por TNCS. El estadio de blastocisto se alcanzó tanto para los ovocitos enucleados inyectados con fibroblastos transgénicos (Tratamiento 2, T2), como para los inyectados con fibroblastos control (Tratamiento 1, T1). En el T1 se logró generar 160 cigotos en total, lo que representa un 59 % de eficiencia de fusión. Sin embargo, solo 30 embriones del T2 desarrollaron hasta el estadio de blastocisto, lo que indica que la eficiencia global de la técnica fue del 18,75 % en promedio.

El bajo rendimiento arrojado por la técnica dada la calidad de las células transgénicas criopreservadas empleadas para transferencia se reflejó en el bajo porcentaje de fusión. Se observó un gran número de fibroblastos no fusionados luego de la activación química (Figura 25).

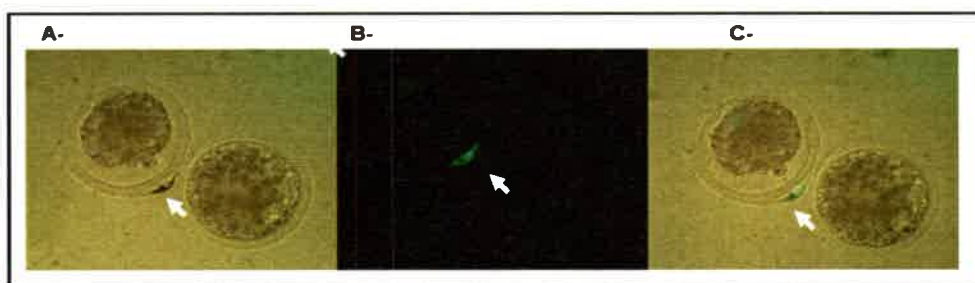


Figura 25. Electrofusión. La flecha blanca indica un fibroblasto fetal bovino no fusionado luego de la electrofusión, seguida de la activación química. (A) campo claro ;(B) Excitación con luz UV;(C) imágenes superpuestas.

Desarrollo in vitro y expresión del gen ZsGreen1 en embriones bovinos generados por transferencia nuclear de células somáticas.

Si bien se observaron diferencias significativas entre las tasas de clivaje de los tratamientos 1 y 2 ($p < 0,0001$), las tasas de desarrollo hasta el estadio de blastocisto en los embriones transgénicos no fue estadísticamente diferente al desarrollo alcanzado por

aqueellos embriones generados por TNCS control ($p>0,05$) (Figuras 26 y 27). Desde el momento en que los ovocitos son transferidos y activados, tienen lugar procesos claves en el desarrollo y cualquier modificación en el ambiente durante el periodo post activación compromete el proceso de crecimiento para llegar a blastocisto.

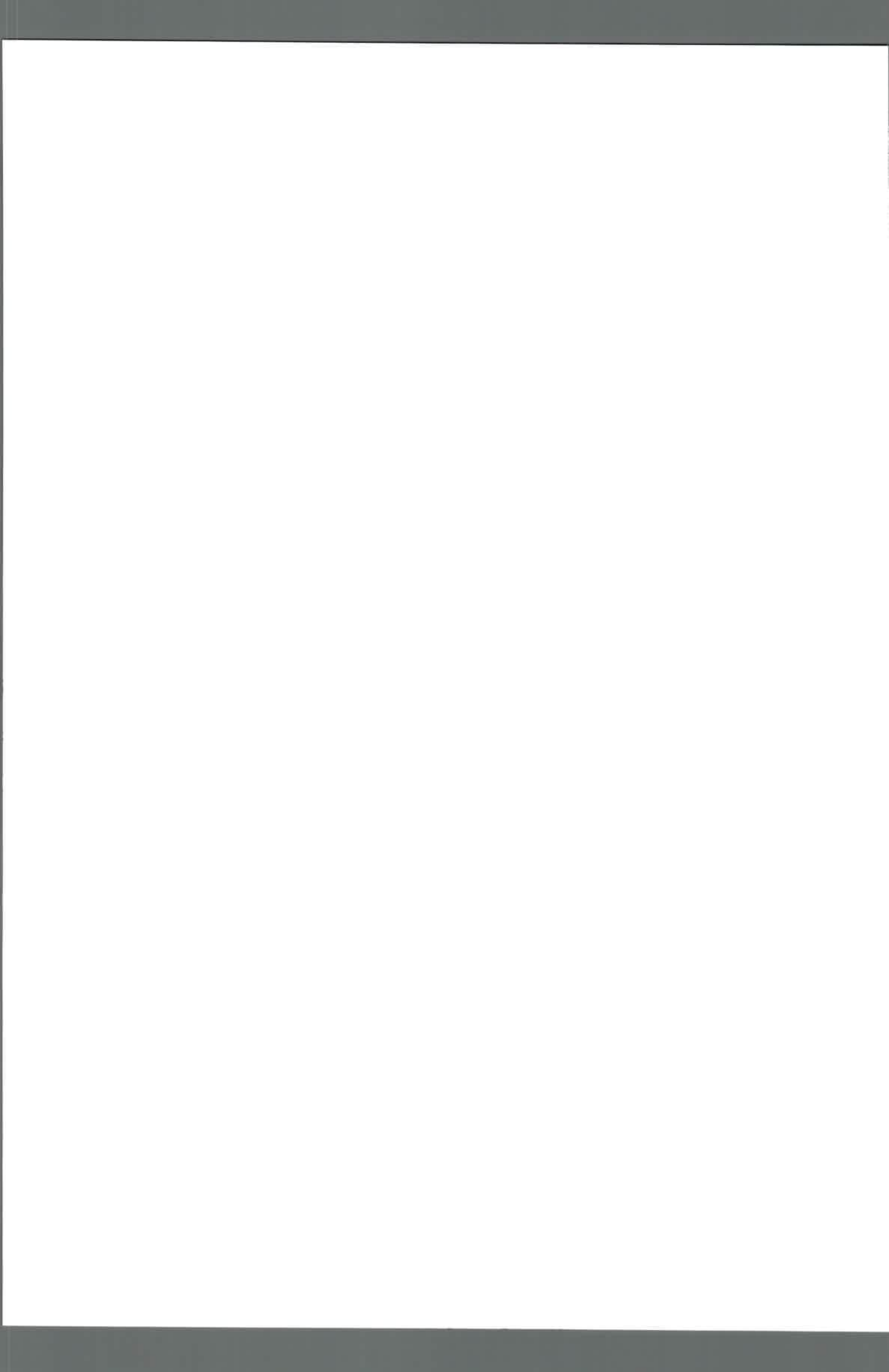


Tabla V. Desarrollo *in vitro* y expresión del gen ZsGreen1 en embriones bovinos generados por TNCS.

Sesiones de TNCS	Ovocitos MII (n)	Clivados (%)	Blastocistos (%)#	¶ Embriones 2-16 células (%)#	¶ Mórulas (%)#	¶ Blastocistos (%)*
Tratamiento 1 FFB Control	268	160 (59,7)	30 (18,75)	na	na	na
Tratamiento 2 FFB Transgénico	180	41 (22,77)	8 (19,51)	20 (48,78)	15 (36,58)	6 (75)*
Tratamiento 3 Partenogénesis	74	na	27 (42,85)	na	na	na

sobre tasa de clivaje; * sobre tasa de blastocistos totales na: no aplica ¶: Transgénicos

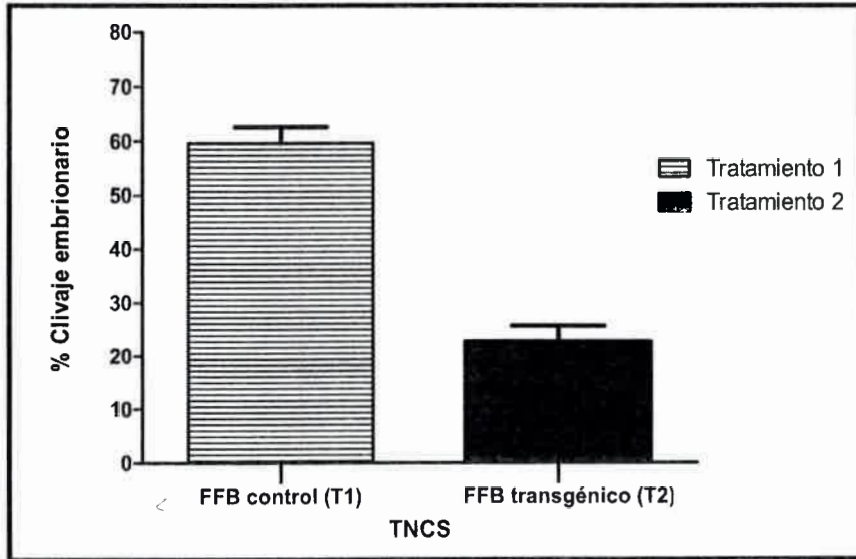


Figura 26. Análisis de clivaje embrionario (FFB control vs FFB transgénicos). Los gráficos muestran el promedio para cada tratamiento \pm el error estándar.

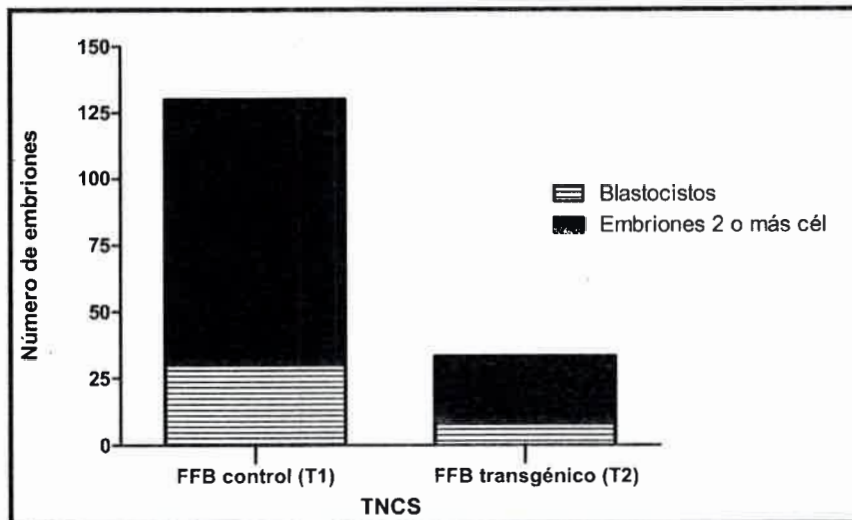


Figura 27. Análisis de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto luego de transferencia nuclear de células somáticas. Las barras con líneas horizontales indican en n° de blastocistos, mientras que las barras negras se corresponden con el n° de embriones de dos o más células respecto del total de embriones que desarrollaron después de los tratamientos 1 y 2.

En la figura 28 se muestran fotografías de la expresión de la proteína fluorescente verde en los embriones observados al día 4. La mayoría de los embriones transgénicos que desarrollaron a dos células o más presentaron mosaicismos para el transgén ZsGreen1.

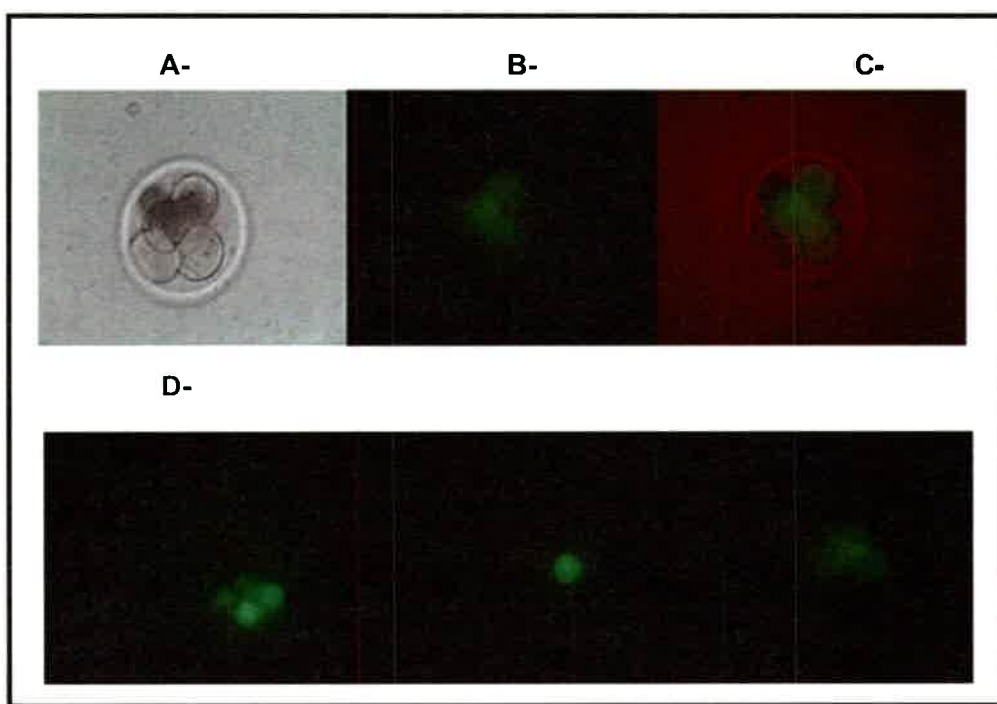


Figura 28. Embriones bovinos transgénicos generados por transferencia nuclear de células somáticas al día 4. (A) Fotografía a Campo Claro;(B) Fotografía del mismo embrión con luz UV; (C) Superposición de imágenes *merged* (D) Se muestran tres embriones bovinos transgénicos al día 4, que expresan la proteína fluorescente verde ZsGreen1 en algunas de sus blastómeras.

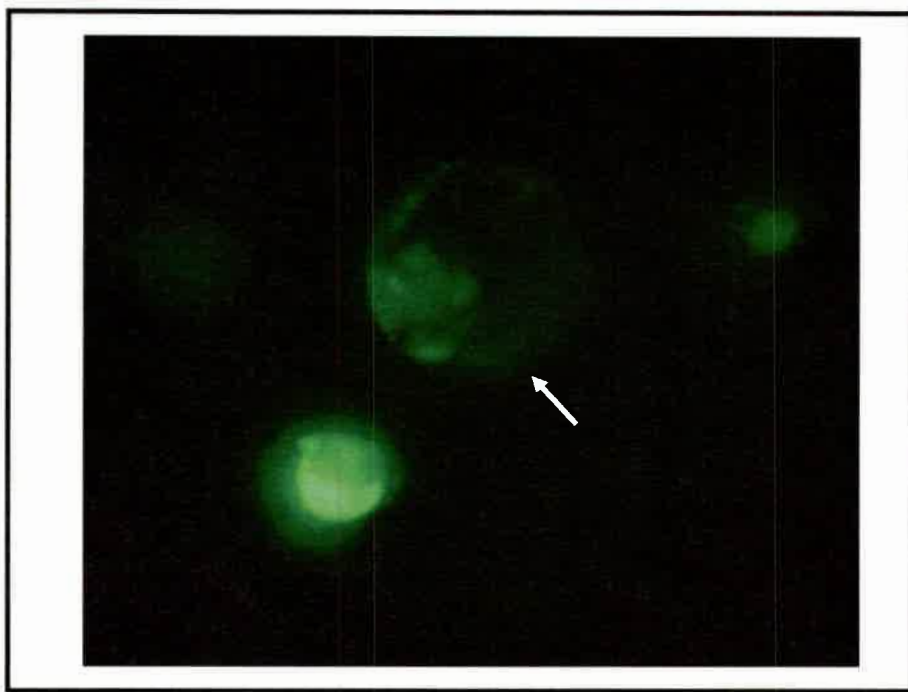


Figura 29. Blastocisto bovino generado por transferencia nuclear de células somáticas al día 7. La figura muestra cuatro embriones bovinos transgénicos generados por TNCS. La flecha blanca indica un blasctocisto al día 7

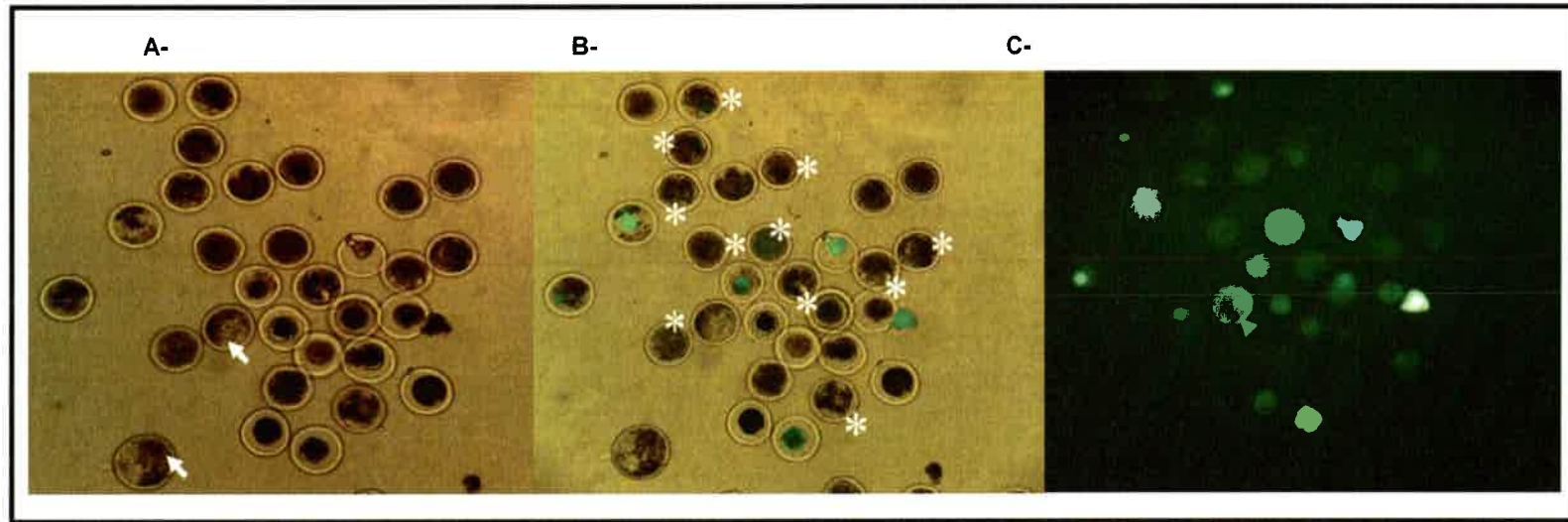


Figura 30. Embriones bovinos generados por TNCS al día 7. Fotografía de embriones bovinos transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde ZsGreen1. (A)- Fotografía a Campo Claro (B)- Superposición de imágenes *merged* (C)- Fotografía del mismo embrión con luz UV. Las flechas blancas indican blastocistos, la punta de flecha muestra un blastocisto transgénico. Los asteriscos indican embriones en el estadio de 2 o más células. Todo el resto pertenece a embriones degenerados producto de artificios propios de la técnica de TNCS.

ETAPA 3: Producción de embriones bovinos transgénicos por ICSI

En la última etapa este capítulo se realizó la puesta a punto de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides en bovinos.

Se empleó un total de 753 ovocitos madurados *in vitro* en los experimentos que se detallan en este capítulo. Se realizaron varias sesiones de ICSI comparando entre protocolos seguidos o no de asistencia de activación química. Los ovocitos inyectados fueron puestos en cultivo embrionario hasta el día 7. Los resultados del desarrollo embrionario se muestran en la tabla VI.

El control de inyección *sham* ICSI, no derivó en desarrollo embrionario, aunque tampoco se observó clivaje de los ovocitos MII tratados. La tasa de clivaje observada 40 % (16/40) cuando se realizó ICSI asistida por Io-6-DMAP arrojó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) respecto de la tasa de clivaje de la ICSI sin asistencia química (5,71% (2/35)). Los ovocitos inyectados sin activación química alcanzaron tasas de clivaje muy bajas del orden del 5,71% (2/35). El 100% de estos embriones se quedó detenido en estadios de 2-32 células, sin progresar a mórulas ni blastocistos.

El desarrollo hasta estadio de blastocisto de los embriones derivados del grupo de ovocitos MII control activados por partenogénesis fue de 42,85% (27/63).

El estadio de blastocisto solamente fue alcanzado en aquel grupo de ovocitos inyectados y asistidos mediante activación química, alcanzándose una tasa de desarrollo del 15% respecto de los controles 0%. En razón de estas diferencias observadas, se optó por utilizar asistencia química de los ovocitos inyectados.

Tabla VI. Desarrollo de embriones bovinos producidos por ICSI con sin asistencia por activación química.

Sesiones	Ovocitos MII (n)	Clivaje (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
Sham ICSI	25	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ICSI Sin Activación Química	35	2 (5,71)	0 (0)	0 (0)
ICSI + activación 16_6-DMAP	40	16 (40,00)	8 (20,00)	6 (15,00)
Partenogénesis	63	35 (55)	30 (47,61)	27 (42,85)

EXPERIMENTO 4: Evaluar la tasa de transgénesis mediada por ICSI en presencia de una enzima de restricción de muy baja frecuencia de corte del ADN (reconoce un sitio de restricción de 18 pb).

Se inyectaron un total de 190 ovocitos madurados *in vitro*. Un grupo de ovocitos MII fue inyectado con espermatozoides intactos (control), mientras que otro grupo fue inyectado con espermatozoides previamente incubados junto al transgén I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en su conformación circular covalente cerrada (CCC). La incubación de los espermatozoides con el ADN no afectó a la producción de embriones, obteniéndose tasas de división embrionaria y producción de blastocistos similares en ambos grupos ($p>0.05$). (Figura 31)

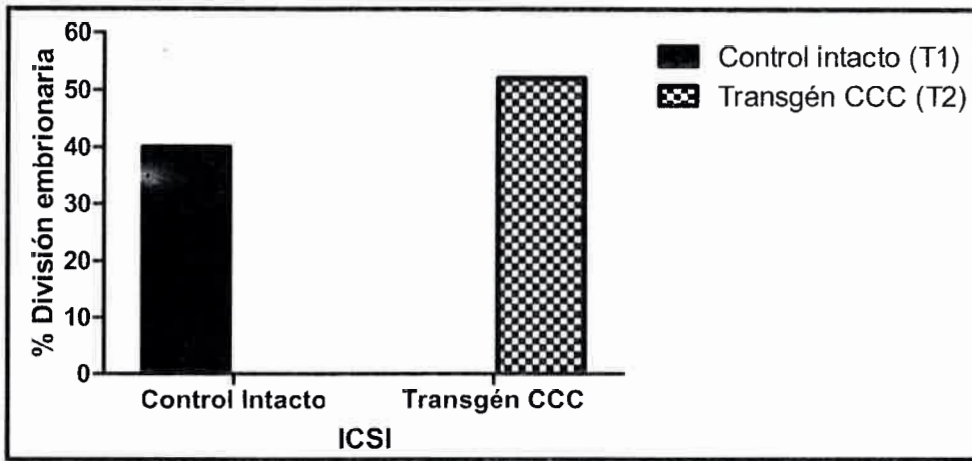


Figura 31. Análisis de clivaje embrionario luego de ICSI-SMGT. Tratamiento 1 (T1): Se inyectó solamente un espermatozoide dentro de un ovocito maduro. Tratamiento 2 (T2): Los espermatozoides se incubaron con la construcción I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en su conformación circular covalente cerrada (CCC) y posteriormente un espermatozoide fue inyectado en el citoplasma de un ovocito maduro MII.

En el primer experimento se evaluó la tasa de transgénesis mediada por ICSI con la meganucleasa I-SceI, una enzima de restricción de muy baja frecuencia de corte que reconoce un sitio de restricción de 18 pb.

Se consideraron dos grupos experimentales, un grupo de ovocitos MII inyectados con espermatozoides preincubados con el transgén más la enzima de restricción I-SceI, y otro grupo inyectado con espermatozoides más la mezcla de digestión del transgén con la meganucleasa. Los resultados se muestran en la tabla VII.

Se observó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,0001$) en la tasa de clivaje 11,11% (5/45) cuando se realizó ICSI con el transgén CCC más la enzima I-SceI respecto de la tasa de clivaje de ICSI empleando I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo en su conformación circular covalente cerrada (CCC) (52% (26/50)). No se observó desarrollo embrionario en el grupo experimental inyectado con la enzima.

La figura 32 muestra los embriones bovinos transgénicos producidos por ICSI usando espermatozoides previamente incubados con el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo y la enzima de restricción I-SceI.

Tabla VII. Transgénesis mediada por ICSI con una enzima de restricción de muy baja frecuencia de corte del ADN, la *I-SceI*. Parámetros del desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos inyectados con espermatozoides intactos e incubados con ADN (+ADN).

ICSI-SMGT	Ovocitos MII (n)	Clivaje (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)	¶ Embriones 2-16 células (%) #	¶ Mórulas (%)	¶ Blastocistos (%)*
Tratamiento 1 Espermatozoide intacto	40	16 (40,00)	8 (20,00)	6 (15,00)	na	na	Na
Tratamiento 2 Transgén CCC	50	26 (52,00)	7 (14,00)	5 (10,00)	9 (34,61)	5 (71,42)	4 (80,00) *
Tratamiento 3 Transgén CCC + I-SceI	45	5 (11,11)	0(0)	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tratamiento 4 Mezcla de digestión	55	33 (60)	9 (16,36)	8 (14,54)	13 (39,39)	7 (77,77)	6 (75,00)
Partenogénesis	33	23 (69)	20 (60)	16 (48)	na	Na	Na

Evaluación de la expresión del gen ZsGreen1 en grupos con ADN. # sobre tasa de clivaje total ; na: no aplica

¶: Transgénicos * sobre tasa de mórulas/blastocistos totales (según corresponda).

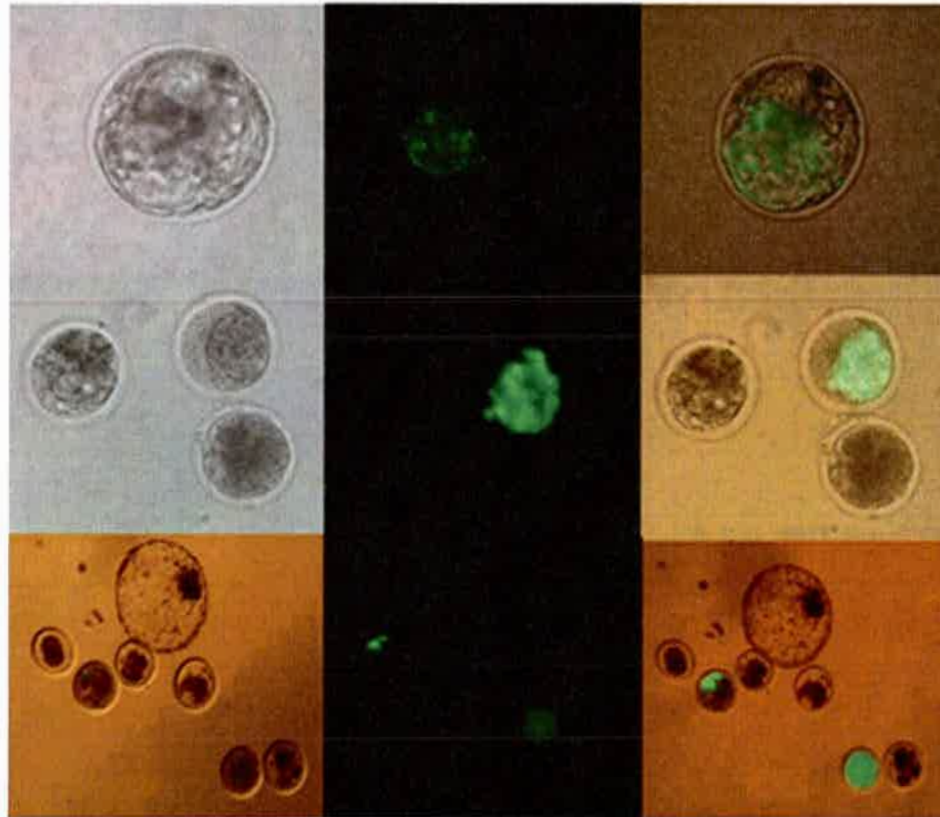


Figura 32. Embriones bovinos transgénicos producidos por ICSI usando espermatozoides previamente incubados con el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo y la enzima de restricción I-SceI

Sexado de embriones generados por ICSI-transgénico mediante DGP con líquido blastocélico

Finalmente, se puso a punto un nuevo protocolo de sexado (PGD) empleando líquido blastocélico de los embriones generados por ICSI con activación química y así descartar la posible generación de embriones partenogénéticos producto de la activación química.

La secuencia amplificada del gen TSPY tiene 153 pb solo en los machos y el de GAPDH tiene una banda de 194 bp en los dos sexos. Por lo tanto los machos a presentan dos bandas: una de TSPY y una de GAPDH y las hembras una sola banda: la de GAPDH (figura 33).

Se logró amplificar 4 de 5 embriones bovinos producidos *in vitro* por ICSI-SMGT asistido químicamente. 80% de los embriones analizados fueron machos.

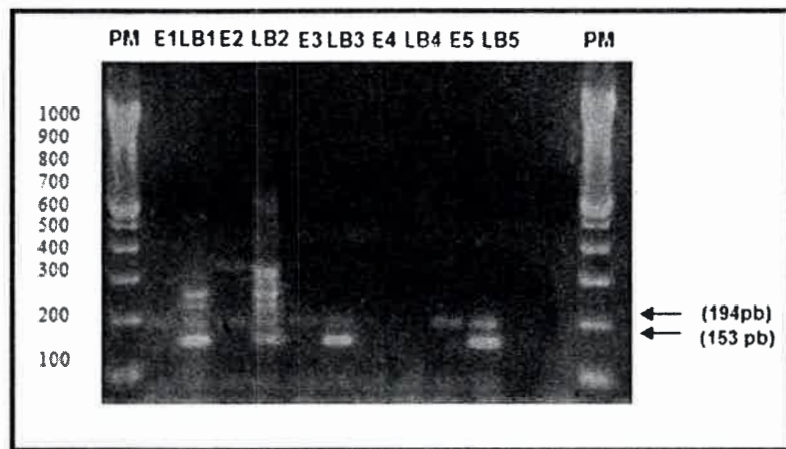


Figura 33. Puesta a punto de biopsia embrionaria a partir de líquido blastocélico. Se muestran los productos de amplificación empleando como molde embriones totales y su respectivo líquido blastocélico en un gel de agarosa 2% de 5 blastocistos generados por ICSI. E=Embrión- LB=Líquido blastocélico. PM= Peso molecular. 100pb (invitrogen).

Se evaluó además la tasa de transgénesis mediada por ICSI en equinos cuando se emplea la meganucleasa.

Cuando se realizó ICSI sin activación química en ovocitos equinos MII se observaron niveles similares en las tasas de división embrionaria y formación de mórulas tanto para el grupo control (espermatozoides equinos intactos) como para el

grupo experimental (espermatozoides equinos incubados con la mezcla de digestión de la meganucleasa I-SceI).

No se observó desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, (**tabla VIII**). sin embargo el 33,33 % (1/3) de las mórulas resultó ser transgénicas (figura 34)

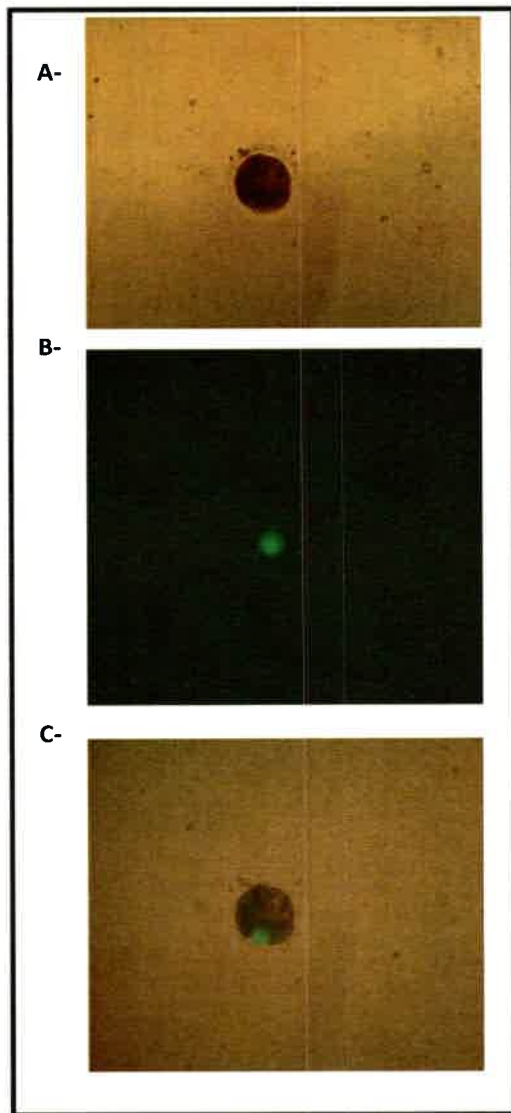


Figura 34. Embrión equino transgénico generado por ICSI-SMGT. (A) Fotografía a Campo Claro ; (B) Fotografía del mismo embrión con luz UV; (C) Superposición de imágenes (*merged*).

Tabla VIII. Transgénesis mediada por ICSI en equinos empleando una enzima de restricción, la meganucleasa *I-SceI*.

Sesiones de ICSI	Ovocitos MII (n)	Clivaje (%)	Mórulas (%)#	Blastocistos (%)#	¶ Embriones 2-16 células (%) #	¶ Mórulas (%)*	¶ Blastocistos (%)
Control intacto	14	8 (57,14)	3 (37,50)	0 (0)	na	na	na
Mezcla de Digestión	25	12 (48,00)	3 (25,00)	0 (0)	1 (8,33)	1 (33,33)	0 (0)

(%)# porcentaje sobre tasa de clivaje total ; * sobre tasa de mórulas totales ; na: no aplica

¶: Transgénicos

EXPERIMENTO 5: Evaluar la transgénesis mediada por ICSI cuando se emplea una enzima de restricción de alta frecuencia de escisión del ADN (reconoce un sitio de restricción de 6 pb).

La división embrionaria para el grupo experimental inyectado con la mezcla de digestión fue de un 60% (33/55), y 8 de ellos llegaron a estadio de blastocisto (14,54%). De los embriones obtenidos, 26 (47,27%) de ellos expresaban la proteína verde fluorescente ZsGreen1. Los embriones que expresaban la proteína reportera, se encontraban en diferentes estadios, desde embriones de 2 células hasta blastocisto. En total se generaron 6 (75%) blastocistos transgénicos. Algunos de los embriones transgénicos presentaban mosaicismo, es decir no todas las blastómeras del embrión expresaban el gen ZsGreen1.

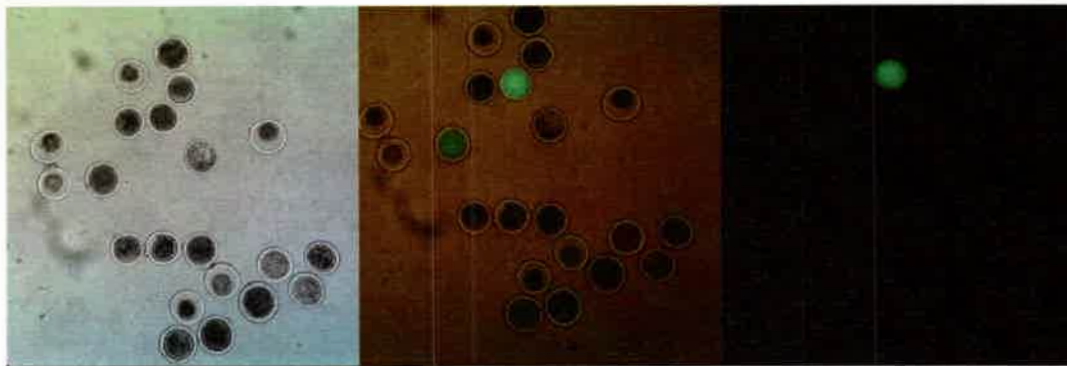


Figura 35. Embriones bovinos transgénicos producidos por ICSI usando espermatozoides previamente incubados con el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo y la enzima de restricción BssHII.

Transgénesis mediada por ICI- FIV empleando la meganucleasa I-SceI

La inyección en ovocitos MII previo a la FIV con mezcla de digestión de la enzima resultó en bajas tasas de clivaje y de desarrollo embrionario. Aquellos que expresaron ZsGreen1 fueron embriones de 1-16 células y mórulas.

Tabla IX. Transgénesis mediada por ICSI con una enzima de restricción de alta frecuencia de corte del ADN, la *BssHII*

Sesiones de ICSI	Ovocitos MI! (n)	Clivaje (%)	Mórulas (%)#	Blastocistos (%)#	¶ Embriones 2-16 células (%) #	¶ Mórulas Blastocistos (%)*	Blastocistos (%)*
Control	40	16 (40,00)	8 (20,00)	6 (15,00)	na	na	na
Transgén circular	50	26 (52,00)	7 (14,00)	5 (10,00)	9 (34,61)	5 (71,42)	4 (80,00)*
Transgén + BssHII	40	2 (5,00)	2 (100,00)	0 (0)	0	0	0
Mezcla de Digestión	42	4 (9,52)	4 (100,00)	0 (0)	0	0	0
Partenogénesis	30	20 (66,60)	17 (56,60)	15 (50,00)	na	na	na

(%)# porcentaje sobre tasa de clivaje total ; na: no aplica ¶: Transgénicos * sobre tasa de mórulas/blastocistos totales (según corresponda)

Tabla X. Transgénesis mediada por ICI- FIV empleando la meganucleasa I-SceI

Tratamiento	Ovocitos (n)	Clivaje (%)	Blastocistos (%)	¶ Embriones 2-16 células (%) #	¶ Mórulas (%)	¶ Blastocistos (%)
Control	95	30 (31,57)	5 (5,2)	na	na	Na
Inyección						
Transgén CCC	40	12 (30)	0 (0)	7 (58,33)	4(33,3)	0 (0)
Transgén+	55	20(36,36)	0 (0)	10 (50)	4(20)	0 (0)
I-SceI						
Control	105	65 (61,90)	15 (14,3)	Na	na	Na
denudados FIV						

(%)# porcentaje sobre tasa de clivaje total ; na: no aplica ¶: Transgénicos.

Capítulo I

DISCUSIÓN

Discusión

La ingeniería genética y la reprogramación de organismos vivos representan las nuevas fronteras biotecnológicas que permitirán generar animales con modificaciones precisas en sus genomas para un sinnúmero de aplicaciones biomédicas y agropecuarias. Se han empleado varios métodos biológicos, químicos y físicos para lograr la modificación genética de células en cultivo. Estos incluyen métodos mediados por virus (Pfeifer y col., 2001; Hachein-Bey-Abina S y col., 2002; Roesler y col., 2002; Woods y col., 2003) métodos basados en polímeros catiónicos, nucleofección, lipofección (Schenborn y col., 2000; Holmen y col., 1995; Washbourne y col., 2002), inyección directa, biobalística, electroporación, irradiación empleando láser, sonoporación y nanopartículas magnéticas (O'Brien y col., 2006; Inoue y col., 2001; Yao y col., 2008; Kim y col., 1996; Dobson y col., 2006). Las limitaciones de estos métodos de transferencia directa de genes se reflejan en la baja eficiencia de transfección y en muchas oportunidades causando efectos citotóxicos, los cuales conllevan a una expresión transitoria del transgén y a la muerte celular (Ortega y col., 2011; Ortega y col., 2012; Forcato y col., 2012; Scilingo y col 2011).

Para la generación de embriones bovinos transgénicos mediante transferencia nuclear de células somáticas se necesita un tipo apropiado de célula donante. Los fibroblastos ya sean de origen fetal u obtenidos de biopsias de piel de animales adultos han sido utilizados como donantes de núcleos en varios sistemas de clonación debido a la relativa facilidad para establecer un cultivo primario (Alonso-González y col., 2012; Wilmut y col., 1997; Schnieke y col., 1997; Wells y col., 1999; Polejaeva y col., 2000; Keefer y col., 2001).

El uso de los métodos basados en la intercalación al azar del transgén se limita a aquellos casos en que se persigue la incorporación de nueva información genética, por ejemplo incorporar secuencias que codifican para la expresión de una proteína heteróloga (Schnieke y col., 1997). Algunas observaciones interesantes se desprenden de los resultados obtenidos en el primer experimento. En primer lugar, la transgénesis mediada por la meganucleasa I-SceI aumenta significativamente la integración al azar de ADN exógeno en fibroblastos fetales bovinos en cultivo, favoreciendo la obtención de líneas celulares transgénicas. El número de colonias de células fluorescentes,

aumentó 6,4 veces en el grupo experimental donde la construcción genética (flanqueada por sitios de restricción para la meganucleasa) se introdujo a células en cultivo que expresaron transitoriamente (a partir del plásmido pCBASce) la misma endonucleasa, respecto del número de colonias desarrolladas en el grupo control en la que no interviene la enzima de restricción I-SceI. Se transfectaron diversas líneas celulares empleando el sistema mediado por la meganucleasa I-SceI. Todas estas líneas derivaron de cultivo primario de fibroblastos fetales de animales de faena de raza aleatoria, tales como de la Holando, fibroblastos adultos bovinos y fibroblastos adultos equinos. Alternativamente también se trabajó con las líneas celulares inmortales HEK293 y MDBK.

Un obstáculo importante para la clonación de animales a partir de fibroblastos transgénicos es el tiempo de vida limitado y la rápida senescencia de los fibroblastos derivados de cultivos primarios luego de la selección positiva con antibióticos. Además, el largo plazo del proceso de selección con antibióticos puede traer aparejadas aberraciones cromosómicas, y en consecuencia una heterogeneidad en la población clonal, a pesar de ser derivada de una sola célula. La vida útil de los fibroblastos fetales resistentes a G418 parece diferir entre especies, y esto puede reflejar una toxicidad especie-específica de la neomicina (Yan y col., 2009). Respecto a la calidad de los tipos celulares estudiados luego de la selección positiva, se observó presencia de núcleos marcadamente picnóticos, granularidad alrededor del núcleo, citoplasma disperso, forma redondeada, vacuolización citoplásmica, y pérdida de adherencia de las células a la placa. Estas observaciones, en las que las células aumentaban su volumen, típicos signos de senescencia, fueron descritos en varias publicaciones (Hayflick 1965; Oshimura and Barrett 1997). Se intentó cambiar de estrategia y reemplazar el gen de resistencia a G418 por el gen de resistencia a blasticidina, que permite la selección de colonias celulares resistentes en un plazo menor, acortando el paso de selección a tan sólo 7 días, pero por cuestiones de tiempo para concluir el resto de los experimentos planteados no se pudo concluir a tiempo con la construcción plasmídica. Si bien luego de la transfección se realizó un ensayo de electroforesis alcalina en células individuales, los alcances de detección y cuantificación de la técnica se limita a las rupturas en las cadenas del ADN, algo que ocurre normalmente en todas las células y que normalmente se repara con cierta velocidad. Dado que el ensayo de ADN cometa no brinda

información acerca de otras posibles alteraciones genéticas, será necesario realizar este ensayo en combinación con otras técnicas de genotoxicidad, tales como el ensayo colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), en las células transgénicas obtenidas en esta tesis luego del proceso de selección positiva. De todas maneras, demostramos que la expresión del transgén se mantiene estable a lo largo del tiempo, tal cual ha sido reportado en otros vertebrados (Thermes y col., 2002; Ogino y col., 2006). El análisis de PCR convencional indicó presencia del producto de amplificación del gen ZsGreen1 en las colonias de células transgénicas analizadas. Desafortunadamente la expresión del transgén está sujeta a los efectos posicionales inherentes a la falta de control sobre el sitio de incorporación del transgén (Al-Shawi y col., 1990). Es común observar una disminución o abolición de la expresión de la proteína transgénica (fenómeno conocido como silenciamiento), originada en modificaciones epigenéticas de las secuencias de ADN incorporadas. Las líneas clonales transgénicas obtenidas en nuestro laboratorio mediante el uso de enzimas de restricción, se utilizaron en el experimento 3 como donantes de núcleos en clonación.

En nuestro segundo experimento, planteamos la estrategia inversa a fines de establecer una metodología transgénica basada en la presencia dentro de las células a ser manipuladas de una endonucleasa endógena. Existen evidencias experimentales que indican que la escisión de la doble hebra de ADN por una enzima de restricción de baja frecuencia de corte, incrementa la ocurrencia de fenómenos recombinatorios en las zonas próximas al sitio de corte (Cohen-Tannoudji y col, 1998; Smih y col., 1995). En estos experimentos se crearon sitios de restricción sintéticos para la meganucleasa dentro del genoma de células de ratón y humanas, especies que no poseen naturalmente sitios de reconocimiento para dicha endonucleasa. Cuando la meganucleasa fue incorporada a las células junto a un transgén (conteniendo secuencias homólogas) se observó un incremento marcado en la frecuencia de fenómenos de recombinación homóloga en la proximidad del sitio de corte de la meganucleasa (Smih y col., 1995; Rouet y col., 1994). En la primera etapa de este trabajo, se generaron también líneas de fibroblastos que expresan constitutivamente la endonucleasa I-SceI las cuales serán transfectadas con un vector portando el transgén (I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo) flanqueado por sitios de restricción para I-SceI. Se cree que éstas líneas serán muy útiles como modelo para estudiar el efecto de las endonucleasas sobre la eficiencia de

integración de ADN heterólogo en células bovinas en cultivo. La aplicación de este principio en líneas celulares primarias de animales mayores será de valor para profundizar y avanzar en los estudios de transgénesis mediada por enzimas de restricción. El mismo enfoque podría conducir al desarrollo de estrategias que permitan aumentar significativamente la eficiencia de los procesos recombinatorios en estas células para la producción de animales transgénicos mediante la técnica de transferencia nuclear.

En la segunda etapa de este capítulo nos propusimos generar embriones genéticamente modificados a través de transferencia nuclear de células somáticas. Los ovarios obtenidos de faena provienen de casi todas las categorías de hembras, en su mayoría hembras pre-púberes o de descarte (juveniles sin actividad ovárica o con ovarios sin folículos de calidad y con fibrosis), por este motivo la calidad y número de folículos presentes en los mismos varía considerablemente dependiendo de la tropa de animales faneados de la cual se recolectan. Aproximadamente el 50 % de los folículos presentes en estos ovarios se encuentran en estado de atresia y, en consecuencia, no todos los ovocitos recuperados son aptos para reanudar la meiosis y la maduración citoplasmática en cultivo (MIV). De todos modos, las eficiencias de producción *in vitro* de embriones obtenidos en este trabajo fueron semejantes a aquellas obtenidas por los grupos de Wrenzycki y col., 2001, Lonergan y col., 2003; y los protocolos utilizados se basan en los trabajos de Campbell y col., (1996), Cibelli y col., (1998) y Lanza y col., (2001). Los embriones obtenidos son representativos de maniobras eficientes realizadas con protocolos actuales. Los datos presentados en este capítulo, demostraron que el gen ZsGreen1 codificado en el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo, construido en nuestro laboratorio, se expresa en embriones bovinos tempranos. Nuestros resultados sugieren que el bajo desarrollo embrionario observado para embriones transgénicos generados por TNSC puede deberse a la integración al azar del transgén, sumado a la mala calidad y deterioro de las células transgénicas criopreservadas y empleadas como donantes de núcleos. Se observó un gran número de fibroblastos no fusionados seguido del paso de activación química. En aquellos embriones viables, la expresión de la proteína fluorescente verde se observó al día 4. Sin embargo, la mayoría de los embriones transgénicos que desarrollaron a dos células o más presentaron mosaicismo para el transgén ZsGreen1. En la construcción plasmídica empleada en nuestros

experimentos, el gen ZsGreen1 se encuentra bajo el control del promotor citomegalovirus (CMV). En un trabajo de Hong y col., 2007 sobre transgénesis en células madre embrionarias de ratón, se comparó el análisis funcional de varios promotores empleando vectores lentivirales sobre estadios tempranos y tardíos de diferenciación *in vitro* de las células madre (células madre, cuerpos embrionarios y precursores neuronales). Su estudio demostró que diferentes promotores muestran propiedades muy diferentes y dinámicas, no sólo en términos de fuerza del promotor, sino también respecto de la actividad específica acorde al estadio de diferenciación de las células. De este estudio se reportó que el promotor CMV solamente fue funcional en estadios tardíos de diferenciación. Esto podría explicar en parte el mosaicismo y la baja tasa de expresión del transgén observada en nuestros embriones generados por clonación e inyección intracitoplasmática de espermatozoides empleando el plasmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo.

Si bien existe la posibilidad de verificar la funcionalidad del vector *in vitro*, por transfección y expresión en células donantes, se sabe que debido a los diversos procesos de reprogramación celular ocurridos durante y luego de la transferencia nuclear, pueden surgir diferencias epigenéticas que afectan en última instancia la expresión de los genes, incluido el transgén (Dean y col., 2001; Humpherys y col., 2002; Vassena y col., 2007, Alonso –González y col., 2012). En reportes previos se investigó la expresión de dos transgenes, resistencia a puromicina y EGFP en líneas celulares transgénicas bovinas y en las células primarias “rejuvenecidas” rederivadas de los fetos generados por clonación. Sin embargo, a pesar de ser aisladas de embriones generados por TNCS desde células precursoras resistentes al antibiótico puromicina, sus células rederivadas fueron sensibles al antibiótico y todas las líneas rederivadas murieron en presencia del mismo. En este mismo estudio, el análisis de la expresión de la proteína EGFP de las líneas celulares originales y las rederivadas mediante citometría de flujo, demostró diferencias en los perfiles de expresión de la proteína verde fluorescente, indicando varios niveles de silenciamiento. Finalmente, el análisis de los niveles de metilación del transgén y de dos secuencias de ADN genómico endógeno para las líneas celulares precursoras y sus rederivadas demostró un aumento notable en la metilación del transgén-específico en todas las líneas celulares rederivadas (Alonso-González y col., 2012). Consistentemente con estos datos de expresión génica, el

mosaicismo en nuestros embriones clonados, quizá podría explicarse por la posible ocurrencia de hipermetilación del transgén ZsGreen1.

Como resultado de la técnica de TNCS, observamos que independientemente de emplear como donante de núcleos, células modificadas o no genéticamente, se obtiene mayor número de presuntos cigotos que de blastocistos. Esto se debe a que a partir del momento en que los ovocitos son activados, ocurren procesos claves en el desarrollo, ergo cualquier modificación en el ambiente durante el periodo de post-activación compromete el proceso de crecimiento para llegar a blastocisto. Cada uno de los obstáculos presentados anteriormente contribuyó a reducir la eficiencia en la producción de embriones transgénicos por TNCS. CRISPR/Cas9 ha tomado notable popularidad en el año 2013. Su fácil diseño basado en la construcción de ARNg guías, hace que éste sea más rápido y barato en comparación con el diseño de otras nucleasas como las ZFN o TALEN, que tras ser clonadas, deben ser seleccionadas posteriormente y validadas. Se pretende a futuro trabajar con este tipo de tecnologías para la modificación genética de células donantes en TNCS.

A fines de mejorar la eficiencia de biotecnologías reproductivas tales como la transferencia nuclear de células somáticas y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Kim y col., 1996), es importante realizar estudios sobre activación partenogenética de ovocitos. Ambas técnicas son empleadas en el ganado vacuno con el objetivo final de aumentar las tasas de desarrollo de embriones y producir descendencia viable. La activación artificial es a su vez importante para dilucidar las funciones de los genomas paterno y materno sobre el control del desarrollo embrionario temprano. En nuestro trabajo se estudiaron protocolos de activación eléctricos y químicos, cada uno de los cuales produjo oscilaciones de calcio y clivaje embrionario, sin embargo por activación eléctrica no observamos desarrollo embrionario (datos no presentados). La activación de ovocitos implica muchos cambios morfológicos y bioquímicos bien definidos, esenciales para el desarrollo normal. Algunos de ellos se producen en cuestión de segundos o minutos después de la interacción membrana plasmática del espermatozoide-ovocito, mientras que otros se producen durante el transcurso de varias horas (Yanagimachi, 1994).

Reportes previos demostraron que, en la mayoría de los animales domésticos, la activación no progresa correctamente después de la ICSI (McEvoy y col., 2003;



Malcuit y col., 2006). En ratones, el 70% de los ovocitos inyectados desarrolla hasta el estadio de blastocisto luego de la ICSI, mientras que en bovinos, la tasa de desarrollo no supera el 12-20%. La mayoría de los grupos realiza ICSI utilizando un costoso dispositivo piezoeléctrico con el que se ven aumentados los porcentajes de blastocistos. Sin embargo, en bovinos la inducción de calcio generada por la ICSI complementada con efecto piezoeléctrico no es suficiente para desencadenar el desarrollo embrionario completo hasta el estadio de blastocisto (Malcuit y col., 2006). En nuestro estudio, el estadio de blastocisto solamente fue alcanzado en aquel grupo de ovocitos inyectados y asistidos mediante activación química, utilizando ionomicina, un ionóforo de calcio, seguido de 4 h de incubación con 6-DMAP (Rho y col., 1998). Se alcanzó una tasa de desarrollo del 15% respecto de los controles. En un trabajo publicado recientemente, Arias y col., 2014 evaluaron cicloheximida (CHX) y 6-DMAP entre otros protocolos de activación química luego de la ICSI en bovinos. Si bien 6-DMAP generó alta tasa de clivaje y desarrollo hasta blastocistos, se encontró que incrementa significativamente las anormalidades cromosómicas y no permite la adecuada formación del pronúcleo masculino, es decir existen altas probabilidades que los embriones sean producto de partenogénesis y no de la ICSI. Una de las ventajas asociadas al uso de medio conteniendo 10 mg/mL CHX por 5 horas en cultivo, es que este reactivo no impide la liberación del segundo cuerpo polar, por lo que no hay que hacer 3 horas ventana luego de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide.

En trabajos anteriores se observó que cuando la enzima I-SceI se inyectó junto a un vector conteniendo el transgén flanqueado por los sitios de restricción de la meganucleasa en embriones de *Oryzias latipens* (pez medaka) y *Xenopus tropicalis*, condujo a la integración temprana del transgén y a un incremento del número de individuos transgénicos comparado con el método convencional de microinyección de ADN. (Thermes y col., 2002 ; Ogino y col., 2006). En todos éstos animales inferiores, con genoma mucho más pequeño que el del bovino, tampoco se encontraron sitios de restricción para I-SceI. Se especula que la endonucleasa por un lado escindiría el transgén a partir del vector, y por el otro promovería su integración al genoma por medio de los mecanismos naturales de reparación del ADN. Si este incremento en la eficiencia de integración del transgén observado en embriones de peces y anfibios puede repetirse en células de mamíferos, tales como en fibroblastos fetales y embriones

bovinos, es una pregunta que no había sido abordada experimentalmente hasta el momento de comenzar esta Tesis. Bevacqua y col., 2013 emplearon un sistema de plásmidos similar al nuestro, también mediado por la I-SceI, e inyectaron la mezcla de digestión con la meganucleasa en presuntos cigotos generados de FIV. Ellos observaron mayores tasas de expresión del transgén para el grupo de presuntos cigotos inyectados posteriormente a la FIV (79,1% vs 63%) respecto un grupo de ovocitos inmaduros inyectados previo a la MIV (31,6% vs 4,7%), con I-SceI y sin la meganucleasa respectivamente. En su estudio, se observó una tendencia de aumento en el número de copias del transgén por inyección con la meganucleasa. Además, la técnica de transgénesis mostró ser eficiente en clonación empleando células del cúmulus como donantes de núcleo. A diferencia de nuestro trabajo, las células donantes de núcleo no fueron seleccionadas con antibiótico, sino que se empleó un método de transfección corto, en la cual no se demostró la integración estable del transgén en el genoma de la célula donante previo a la clonación. Contrariamente con este trabajo, el grupo de Wang y col., 2014 sostiene que la molécula de I-SceI nativa no es capaz de facilitar la transgénesis en embriones de mamíferos mediante microinyección citoplasmática, tal como había sido demostrado en huevos de peces y en bovinos por Bevacqua y col., 2013. En su estudio ellos emplean una molécula de I-SceI modificada que presenta una señal de localización nuclear (NLS-I-SceI), la cual afirman que es capaz transferir fragmentos de ADN desde el citoplasma al núcleo en embriones porcinos. A su vez, luego de la microinyección citoplasmática del ARNm codificante de la NLS-I-SceI junto con plásmidos con un transgén flanqueado por sitios de restricción para la meganucleasa, resultó en la expresión del transgén tanto en embriones de ratón como en porcinos. A diferencia de nuestros resultados, ellos no ven embriones transgénicos con expresión de fluorescencia empleando la meganucleasa nativa.

En la última etapa de este capítulo, nos propusimos poner a prueba la hipótesis en un sistema de transgénesis mediada por ICSI. Dado que el daño físico o químico de la membrana plasmática del espermatozoide ha sido señalado como un factor que mejora la interacción espermatozoide/ADN exógeno, incrementando de este modo el ingreso de ADN al interior del ovocito durante la técnica de ICSI, empleamos espermatozoides congelados y descongelados (Perry y col., 2009). En esta estrategia el transgén (flanqueado por sitios de restricción para una enzima) y la endonucleasa se

introdujeron dentro del ovocito maduro conjuntamente con el espermatozoide durante el procedimiento de ICSI. De esta manera al inyectar el espermatozoide dentro del ovocito también se introdujo un pequeño volumen de medio conteniendo el plásmido y la endonucleasa I-SceI de muy baja frecuencia de corte del ADN (reconoce un sitio de restricción de 18 pb, Experimento 4); o la enzima de restricción BssHII de alta frecuencia de escisión del ADN (reconoce un sitio de restricción de 6 pb, Experimento 5).

La división embrionaria en el experimento 4 para el grupo de ovocitos maduros inyectados con la mezcla de digestión de I-SceI fue de un 60% (33/55), y 8 de ellos llegaron a estadio de blastocisto (14,54%). De los embriones obtenidos, 26 (47,27%) de ellos expresaban la proteína verde fluorescente ZsGreen1. Los embriones que expresaban la proteína reportera, se encontraban en diferentes estadios, desde embriones de 2 células hasta blastocisto. En total se generaron 6 (75%) blastocistos transgénicos. Algunos de los embriones transgénicos presentaban mosaicismo, es decir no todas las blastómeras del embrión expresaban el gen ZsGreen1. Uno de los aspectos negativos de la transgénesis mediada por espermatozoides, podría ser la generación de animales quiméricos, en el caso de que la integración del transgén ocurra posteriormente a la primera replicación del ADN genómico (Moreira y col., 2007; Murakami y col., 1999). Adicionalmente, existe la posibilidad de que el transgén no se integre y permanezca en los embriones en forma episomal. Celebi y col., 2002, reportaron que con las sucesivas divisiones embrionarias, el plásmido en forma episomal se va perdiendo. En especies como murinos y porcinos, se reportó que entre 5 a 25 copias de un transgén pueden integrarse al genoma embrionario dando lugar a animales genéticamente modificados capaces de transmitir el transgén a la siguiente generación (Perry y col., 1999; Kurome y col., 2006). En nuestro caso, el tamaño del transgén (3.321pb) y la baja cantidad de ADN presente en un blastocisto bovino (<6pg) hacen que sea muy difícil la confirmación de la integración estable del transgén al genoma mediante transferencia por *southern blot*. Perry y col., 1999 sugieren que la expresión del transgén hasta el estadio de blastocisto puede ser considerada como evidencia de integración. La ausencia de origen de replicación episomal en el plásmido I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo, nos indicaría que el transgén se encuentra integrado al genoma embrionario de aquellos blastocistos generados en este trabajo que expresan la proteína verde fluorescente.

La inyección con la mezcla de digestión del transgén por la meganucleasa tampoco compromete la viabilidad embrionaria. La meganucleasa introduce rupturas doble cadena altamente recombinogénicas a ambos lados del inserto de interés, y lo protegería frente a la degradación por nucleasas. Alternativamente, se procedió a inyectar ovocitos MII previo a la FIV con mezcla de digestión de la meganucleasa, lo que resultó en bajas tasas de clivaje y de desarrollo embrionario, posiblemente debido a la excitosis prematura de gránulos corticales en respuesta a la inyección (Pereyra Bonnet y col., 2011). Aquellos que expresaron ZsGreen1 fueron embriones de 1-16 células y mórulas.

En el experimento 5, cuando se repitió el ensayo empleando la enzima BssHII, se observó que aquellos ovocitos en los que hubo división embrionaria luego la ICSI con el plásmido acompañado de la enzima de restricción *per se* o con la mezcla de digestión, solamente se alcanzó el estadio de mórulas, no observándose desarrollo hasta blastocisto.

Reportes de Perry y col., 1999; y Yamauchi y col., 2007 sugieren que la inyección de ADN exógeno desnudo dentro del ooplasma seguido de activación química no genera desarrollo de embriones transgénicos. Contrariamente con este estudio, en un experimento preliminar, cuando inyectamos altas concentraciones de plásmido dentro del ooplasma bovino seguido de activación química fue posible generar embriones transgénicos por partenogénesis (Datos no presentados). Finalmente, con el objetivo de descartar la posible generación de embriones partenogénicos producto de la asistencia química en nuestros embriones generados por ICSI, se puso a punto en nuestro laboratorio, un nuevo protocolo de sexado (DGP) empleando como muestra líquido blastocélico de los embriones. Herrera y col., 2015 empleando como modelo de estudio embriones equinos raza polo argentino, sugieren un nuevo enfoque respecto de los diagnósticos preimplantacionales conocidos hasta la actualidad, dado que no se necesita extraer células del embrión. En su estudio realizaron una PCR duplex utilizando cebadores para amplificar una región determinante del sexo Y equina (eSRY) y amelogenina (AMEL). Amelogenina es un gen involucrado en la construcción de esmalte de los dientes y se encuentra en los cromosomas sexuales X e Y. Ellos demostraron la presencia de ADN en el líquido blastocélico, y lograron predecir el sexo exitosamente en 11 de 13 embriones equinos producidos *in vivo*; y 4 de 5 embriones

equinos producidos *in vitro* por ICSI. El ADN presente en el líquido blastocélico podría ser originado de la apoptosis de células embrionarias en el proceso de diferenciación celular.

Capítulo II

Uso de Moduladores de AMPc en la Producción *in vitro* de Embriones Bovinos

- Los resultados obtenidos en este capítulo fueron seleccionados para presentación modalidad póster en la conferencia anual de la International Embryo Transfer Society (IETS). Versalles, Francia, 2015.

Capítulo II

INTRODUCCIÓN



Introducción

Producción in vitro de embriones

El sistema de producción de embriones *in vitro* (PIV) en bovinos consiste en tres pasos que involucran una compleja serie de eventos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, y donde cada uno condiciona el éxito o el fracaso del siguiente: maduración ovocitaria, fecundación del ovocito y cultivo de los cigotos hasta el estadio de blastocisto.

La PIV permite emplear ovarios provenientes de matadero, vacas castradas, o también vacas vivas (mediante la técnica de punción folicular guiada por ultrasonografía; OPU, del inglés *ovum pick up*), produciendo embriones viables de vacas impúberes (Damiani y col., 1996; Palma y col., 1997; Palma y col., 2001), durante los primeros meses de gestación o en estado avanzado de desnutrición.

La PIV es actualmente más costosa que la producción *in vivo* a través de la superovulación, porque requiere de un laboratorio, personal especializado, equipamiento, insumos y una buena logística. Actualmente se puede obtener una tasa de preñez que ronda el 40% con embriones PIV vitrificados. Si bien sigue siendo bajo con respecto a las transferencias de embriones *in vivo*, se compensa con la cantidad de embriones producidos (Mucci y col., 2006).

En este capítulo nos centraremos en el proceso de maduración ovocitaria, como un proceso clave en la adquisición de competencia por parte del ovocito, la cual se ve reflejada luego en los valores de desarrollo y en la calidad embrionaria.

Maduración ovocitaria

En las últimas décadas las técnicas de reproducción asistida, tales como la fertilización *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), se han convertido en opciones atractivas para la investigación y el tratamiento de pacientes con problemas de fertilidad (Mao y col., 2014). A pesar de su continua mejora, la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida sigue siendo baja. Algunos autores asocian esta baja eficiencia a problemas en la competencia ovocitaria originadas

en gran medida en problemas en la maduración ovocitaria *in vitro* (Watson., 2007; Mao y col., 2014).

La maduración ovocitaria se compone principalmente de dos eventos principales, la maduración nuclear y la maduración citoplasmática, los cuales ocurren de manera simultánea en el ovocito.

El proceso de maduración nuclear, corresponde con la etapa en la cual se produce la segregación de los cromosomas y la consecuente progresión de la división meiótica. Dentro del ovario, los ovocitos que se encuentran en el interior de folículos no atresicos permanecen arrestados en la profase I de la meiosis I (MI). Al momento de la ovulación, el ovocito reinicia su meiosis arrestándose nuevamente en la etapa de metafase II (MII), donde permanecerá arrestado hasta la fertilización (Damiani y col., 1996). En el caso de ocurrir efectivamente la fertilización, se completa la meiosis, produciéndose la extrusión del segundo cuerpo polar, y la formación del cigoto (Ferreira y col., 2009).

La maduración citoplasmática abarca todos los eventos que ocurren en el citoplasma del ovocito durante su maduración y puede dividirse en tres eventos principales: La redistribución de organelas citoplasmáticas; la reorganización del citoesqueleto, específicamente de los microfilamentos de actina y microtúbulos; y el almacenamiento de moléculas requeridas para la maduración, fertilización y posterior desarrollo embrionario temprano (maduración molecular).

En condiciones *in vitro* apropiadas, la mayoría de los ovocitos reanudan espontáneamente la meiosis al dejar de estar sometidos a los factores inhibitorios del folículo, completando la maduración nuclear (Fair y col., 1995). Sin embargo, la maduración citoplasmática correspondiente se ve comprometida, generando una baja tasa de desarrollo (Lonergan y col., 2003a).

Cuando los ovocitos son removidos de su ambiente folicular, se produce de manera espontánea el reinicio de la meiosis, generándose una deficiencia madurativa en los mismos. Los ovocitos que se encuentran óptimos para ser ovulados sufren el reinicio de la meiosis como consecuencia de su separación con su ambiente (Edwards., 1965; Sirard y col., 2011). El arresto meiótico en el interior del folículo es generado por diversos factores, en su mayoría producidos dentro del ambiente folicular y contenidos

en el propio fluido folicular (FF), que es muy rico en moléculas y proteínas con actividad biológica, tales como factores de crecimiento, péptidos hormonales, hipoxantina (molécula que inhibe la maduración ovocitaria), junto a otros tantos otros factores que aún no han podido ser identificadoss (Conti y col., 2002; Sutton y col., 2003).

Estudios previos han demostrado que los ovocitos producen y secretan varios factores que regulan la actividad de las células del cúmulus dentro del folículo, e intervienen en la composición del FF (Wrenzycki & Stinshoff, 2013). Otros estudios, muestran que las células de la granulosa que rodean al ovocito son capaces de proveerle a éste de numerosos factores inhibitorios los cuales regulan y sincronizan el reinicio de la meiosis. Estos factores son producidos principalmente por las células de la teca, las paredes del folículo y las células de la granulosa (Romero-Arredondo & Seidel, 1994; Eppig & Downs, 1984; Richard & Sirard, 1996), y son aportados al ovocito a través de uniones GAP (tipo unión célula-célula) y de manera autócrina y/o parácrina. Si estas señales son interrumpidas por ausencia de células de la granulosa o por disrupciones mecánicas, como es el caso del punzado folicular, puede producirse el reinicio espontáneo de la división celular (Conti y col., 2002; Richard & Sirard, 1996; Sutton y col., 2003).

Una molécula clave en los procesos implicados en la regulación y sincronización del estado meiótico es el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual, actúa como segundo mensajero en varios procesos celulares, especialmente en los implicados en las vías de señalización de hormonas gonadotróficas. Varios reportes indican que concentraciones elevadas de AMPc producen un arresto meiótico en el ovocito, el cual es causado por la inhibición del factor promotor de la maduración (FPM). Este arresto es mantenido hasta el momento de la ovulación, donde elevadas concentraciones de hormona luteinizante (LH) producen la ovulación y reinicio de la meiosis (Bilodeau-Goeseels, 2012; Thomas y col., 2002; Tsafiri y col., 1996; Ulloa y col., 2014).

Moduladores de AMPc

Conociendo la importancia del AMPc en los procesos ovocitarios, varios autores postulan a este mensajero químico, al igual que sus análogos, como uno de los actores principales y fundamentales en la regulación y sincronización del reinicio meiótico en el ovocito (Bilodeau-Goeseels y col., 2011; Downs y col., 1986; Luciano y col., 1999; Guixue y col., 2001; Richard & Sirard, 1996; Tsafiriri y col., 1996). El AMPc es producido intrínsecamente por el ovocito mediante una proteína G acoplada a receptor (GPR3). Esta proteína estimula la Adenilato Ciclasa (AC), aumentando los niveles de AMPc en el interior celular. Otra manera de incorporar AMPc al citoplasma, es mediante las uniones GAP entre las células de la granulosa y el ovocito (Bilodeau-Goeseels y col., 2012; DiLuigi y col., 2008).

Es sabido que altas concentraciones de AMPc activan la proteína quinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*), una proteína dependiente de este mensajero, la cual a su vez promueve una serie de cascadas de señales río abajo, causando en última instancia la inactivación del factor promotor de la maduración (Bilodeau-Goeseels y col., 2012). El efecto inhibitorio causado por las elevadas concentraciones de AMPc en el interior del ovocito es de carácter reversible, es decir, que una disminución en la concentración de esta molécula causa el reinicio de la división meiótica (Bilodeau-Goeseels y col., 2011; 2012).

Con el fin de evitar el reinicio de la meiosis y mantener los parámetros fisiológicos del AMPc en el interior ovocito, se han utilizado numerosas moléculas que emulan los efectos del AMPc como es el caso del dibutiril-AMPc (análogo del AMPc); otras que favorecen la producción del mensajero como la Forscolina (FSK), que activa la AC aumentando finalmente los niveles de AMPc intracelulares, o la adenilato ciclasa invasiva (ACi), una toxina producida por *Bordetella pertussis* capaz de incrementar los niveles de AMPc a partir de ATP endógeno celular. También se han empleado sustancias que evitan la degradación del mensajero químico, por ejemplo guanosín monofosfato cíclico (GMPc) que actúa inhibiendo a la fosfodiesterasa 3A (PDE-3A) específica de ovocitos bovinos. Otra molécula muy utilizada es la roscovitina, la cual, si bien no altera directamente los niveles intracelulares del mensajero químico, es capaz de producir la inhibición del FPM, evitando así el reinicio de la meiosis (Bilodeau-

específica para las diversas enzimas, también se detallan en la misma las PDEs no inhibidas por estas moléculas. Algunos inhibidores de PDE son específicos como cilostamida (CIL) o milirinone, capaces de inhibir la PDE-3A, pero también existen otros inhibidores inespecíficos como el 3-Isobutyl-1-methylxanthine, más conocido como IBMX. Un inhibidor natural de PDEs es el GMPc el cual también es proporcionado al ovocito por las células del cúmulus mediante uniones estrechas o de tipo GAP (Albuz y col.,2010).

Tabla XI. Inhibidores de fosfodiesterasas. Se muestran los inhibidores de fosfodiesterasas (IBMX, cilostamida, rolipram y dipiridamole) junto a las enzimas inhibidas por cada uno, como así también, las enzimas no inhibidas.

Inhibidores de fosfodiesterasas	Fosfodiesterasas inhibidas	Fosfodiesterasas NO inhibidas
IBMX	PDE-1; PDE-2; PDE-3; PDE-4;PDE-7; PDE-10; PDE-11	PPDE-8
Cilostamida	PDE-3	PPDE-1; PDE-2; PDE-4; PDE-7;PDE-8; PDE-10
Rolipram	PDE-4	PDE-1; PDE-2; PDE-3; PDE-7; PDE-8; PDE-10; PDE-11
Dipiridamole	PDE-7; PDE-8;PDE-10; PDE-11	PDE-1; PDE-2; PDE-3; PDE-4

Marcadores de calidad embrionaria

Varios parámetros han sido usados como indicadores de calidad embrionaria, entre ellos, la cinética de clivaje y los niveles de producción embrionaria; las tasas de eclosión, el conteo del número de células por embrión, los valores de recuperación post-congelado, el diámetro de los embriones, el tiempo de cultivo, entre otros (Lonergan y

col., 2003; Rizos y col., 2002; Watson., 2007).

Un indicador rápido de competencia ovocitaria y calidad embrionaria es la cinética de clivaje y desarrollo embrionario. La observación en lupa estereoscópica de embriones de al menos dos células puede ser realizada tanto a las 24 h como a las 48 h de comenzada la FIV. Los cigotos provenientes de ovocitos de mayor competencia suelen presentar una mayor tasa de división y sus embriones presentan una velocidad de desarrollo mayor hacia el estadio de blastocisto (Lonergan y col., 2003; Van Soom y col., 1997). Es por esto que el comprender más detalladamente los eventos implicados en el desarrollo embrionario puede ayudar a aumentar el número y la calidad de los embriones producidos (Holm y col., 2002).

El fenómeno de eclosión de blastocistos en cultivo, puede también ser utilizado como un marcador de calidad embrionaria. Este evento es necesario para la posterior implantación del embrión en el útero materno. Varios trabajos han reportado que la transferencia de embriones eclosionados de manera natural o asistida puede aumentar las tasas de preñez (Chimote y col., 2013; Taniyama y col., 2011; Van den Abbeel y col., 2013).

Estudios previos han demostrado que el número de células presentes en los embriones puede ser utilizado como un indicador de calidad y viabilidad embrionaria (Lazzari y col., 2002; Ushijima y col., 2008). Embriones de “buena calidad” suelen presentar un número mayor de células. El conteo puede ser realizado en cualquier estadio del cultivo una vez culminada la fertilización. Otros trabajos muestran que el número de células presentes en los embriones puede variar dependiendo del origen de estos, ya sea *in vivo* o *in vitro*. También se observó que dependiendo del día de análisis la diferencias en el número de células entre ambos métodos de producción puede ser más pronunciada, especialmente después del día 7 de cultivo (Mori y col., 2002; Ushijima y col., 2008).

La criopreservación permite la conservación y el transporte de embriones durante periodos prolongados de tiempo hasta su posterior transferencia. Es sabido que embriones de buena calidad tienen una mejor respuesta a la criopreservación que embriones de calidad regular o mala, por esto la recuperación de embriones post-congelado suele estar asociada la calidad embrionaria. Actualmente se estudian

diferentes protocolos con el objetivo de aumentar la eficiencia del proceso de criopreservación y recuperación embrionaria (Belascoain y col., 2010; Fahning y col., 1992; Wang y col., 2014).

Entendiendo los eventos moleculares implicados en el proceso de maduración ovocitaria y la importancia de estos en la producción *in vitro* de embriones, en el segundo capítulo de esta Tesis, proponemos el uso de moduladores de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en el proceso de maduración ovocitaria, como una herramienta alternativa al sistema de maduración convencional para incrementar la producción y la calidad de los embriones bovinos obtenidos por fertilización *in vitro*.

Capítulo II

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Objetivos específicos

- a) Analizar el efecto de los moduladores de AMPc en los niveles de maduración y en las tasas de clivaje embrionario.
- b) Estudiar la producción de embriones por fertilización *in vitro* en ovocitos madurados mediante el tratamiento estándar y el sistema bifásico.
- c) Analizar la calidad de los embriones producidos:
 - Cinética de desarrollo embrionario.
 - Niveles de eclosión.
 - Número de células por embrión.
 - Resistencia a la criopreservación.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

Sólo se detallarán los materiales y métodos no descriptos en el capítulo anterior.

Diseño experimental

Nos propusimos poner a prueba nuestra hipótesis de trabajo por lo cual subdividimos éste segundo capítulo en dos etapas: Etapas 1: estandarizar la producción *in vitro* de embriones bovinos de manera convencional y mediante el uso de moduladores de AMPc; y Etapa 2: realizar el análisis de los parámetros de calidad embrionaria sobre los embriones producidos por ambos tratamientos.

ETAPA 1: Estandarizar la producción *in vitro* de embriones bovinos de manera convencional y mediante el uso de moduladores de AMPc.

Maduración in vitro estándar

Las condiciones de MIV estándar fueron descriptas en el capítulo I.

Maduración bifásica empleando moduladores de AMPc

El proceso de maduración empleando moduladores de AMPc, lo denominaremos bifásico dado que se divide en dos etapas. En la primer etapa, de pre-maduración *in vitro* (PRE-IVM), los COCs seleccionados fueron colocados en grupos de 40 por pocillo, en placas de 4 pocillos conteniendo 500 μ l de medio de maduración base TCM-199 Earle's suplementado con 500 μ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y 100 μ M de forskolina (FSK) durante 2 h. Luego de 2 horas de PRE-IVM, los COCs fueron lavados en medio de maduración base e incubados en 500 μ l de medio de maduración base suplementado con 20 μ M de cilostamida (CIL) y rhFSH durante 24 h a 38.5°C, en una atmósfera de 5 % CO₂ y 99 % de humedad. Transcurrido ese tiempo se evaluó la maduración nuclear por la presencia del primer corpúsculo polar en espacio perivitelino.

Fertilización in vitro

Las condiciones de procesamiento del semen y capacitación espermática fueron descritas en el Capítulo I. Luego de realizar la columna de miniPercoll®, el pellet obtenido que contiene los espermatozoides móviles fue resuspendido en 200 µL de medio de fertilización IVF-SOF (107,7 mM NaCl, 7,1 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, penicilina 25 UI, 7,3 mM piruvato de Na, 3 % BSA, 2 mM fructosa, 1,8 mM CaCl₂·2H₂O, 5,4 mM lactato de Na). Para realizar la fecundación se colocaron grupos de hasta 40 COC madurados *in vitro* (de acuerdo con los protocolos estándar o bifásico) en placas de 4 pocillos conteniendo 400 µl de medio de fecundación IVF-SOF por pocillo, previamente equilibrado en estufa gaseada con 5 % CO₂ y 99 % de humedad. Se fecundó con una dosis inseminante de 1 x10⁶ espermatozoides /mL. Se analizaron las tasas de clivaje a las 48 horas y las tasas de desarrollo embrionario al día 7 y 8 de cultivo para ambos tratamientos.

Determinación del estado de capacitación espermática

Con el objetivo de determinar el estado de capacitación espermática se analizaron mediante la técnica de clortetracina (CTC) los espermatozoides criopreservados empleados para fecundación. Se tomaron 20 µl de muestra y se agregó el mismo volumen de diluyente CTC (30 mg NaCl, 2,4 mg cisteína, 1 mg CTC, 4 ml Tris-HCl 20 mM pH=7,8), en una concentración final de 500 µM. Luego, las células fueron fijadas en suspensión con glutaraldehído 0,2 % y guardadas a 4 °C hasta el momento de su evaluación. Se observaron 200 espermatozoides por muestra. Para el análisis se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i, a una magnificación de 400X, con un filtro de excitación a 365 nm y uno de emisión entre 430-650 nm. Los espermatozoides se visualizaron en una computadora conectada a una cámara Nikon Digital Sight, utilizando el software NIS-Elements BR 3.2 64 bit. Los patrones observados se muestran en la figura 37.

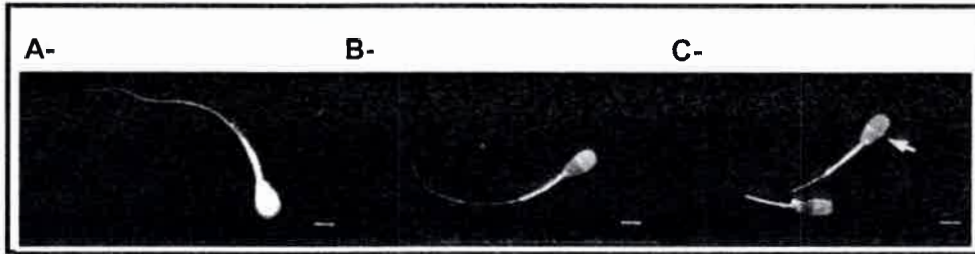


Figura 37. Patrones de la técnica de CTC. (A) Patrón F: espermatozoide intacto no capacitado; (B) Patrón B: espermatozoide intacto capacitado; (C) Patrón AR: espermatozoide reaccionado (Adaptado de Fraser y col., 1995).

Patrón F: fluorescencia en toda la cabeza refiere a un espermatozoide intacto no capacitado

Patrón B: presenta fluorescencia sólo en la región post-acrosomal cuando el espermatozoide está intacto capacitado. Patrón AR: se observa fluorescencia en la zona ecuatorial o simplemente carece de fluorescencia cuando se encuentra reaccionado.

Cultivo embrionario in vitro

Las condiciones de CIV fueron descriptas en el capítulo I.

ETAPA 2: Estudiar parámetros de calidad de los embriones producidos por fertilización *in vitro* de ovocitos madurados mediante el tratamiento estándar y el sistema bifásico.

Análisis de eclosión embrionaria

El análisis de eclosión embrionaria fue realizado en los días 7 y 8 de cultivo por observación de blastocistos bovinos eclosionados bajo lupa estereoscópica.

Cuantificación de células embrionarias

Se lavaron los blastocistos eclosionados en 400 μ l de solución DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco, USA) y posteriormente se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4 % por un período de 30 min. Los embriones fijados fueron enjuagados con DPBS y col.,ocados durante 10 min en 400 μ l de una solución de

Hoechst 33342 (Bis-Binzimida; 5 $\mu\text{g/ml}$). Los embriones fueron colocados individualmente en una alícuota de 5 μl del colorante vital sobre un portaobjeto y montados para su posterior visualización por microscopia invertida de fluorescencia a un aumento de 10X. Los embriones se visualizaron en una computadora conectada a una cámara Nikon Digital Sight, utilizando el software NIS-Elements BR 3.2 64 bit, se tomaron fotografías individuales y se realizó el conteo de células utilizando el programa *Image J* (National Institute of Health).

Criopreservación de embriones

Los embriones fueron criopreservados de acuerdo a un protocolo de descenso lento. Todo el proceso previo al inicio de la curva de descenso de temperatura fue realizado a temperatura ambiente, sin emplear platina térmica. Los embriones a congelar fueron colocados en 500 μl de medio de criopreservación (1,5M Etilenglicol, 0,1M Sacarosa, 10% suero fetal bovino) en placas de 4 pocillos por un periodo de 4 min. Pasado este tiempo se transfirieron los embriones en una gota del mismo medio y posteriormente fueron cargados en la pajuela de criopreservación. Las pajuelas fueron armadas siguiendo las recomendaciones del manual de la IETS: medio, aire, medio con los embriones, aire, medio (ver Figura 38). Se cargaron hasta 10 embriones por pajuela. Una vez cargadas, las pajuelas fueron colocadas por 5 min en la congeladora de embriones a $-6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó la siembra de hielo (*Seeding*), tocando cada columna de medio en la pajuela con una pinza que previamente fue sumergida en nitrógeno líquido. Se mantuvieron otros 5' a $-6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se comenzó la curva de descenso lento de temperatura desde -7°C hasta -35°C a una velocidad de $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mediante el programa de la congeladora. Finalizada la curva se colocaron las pajuelas en nitrógeno líquido y fueron almacenadas.

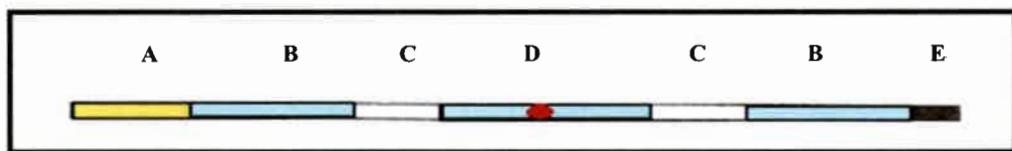


Figura 38. Esquema del armado de pajuela para criopreservación de embriones. A. Tapón de algodón. B. Zona con medio de criopreservación. C. Burbuja de aire. D. Medio de criopreservación con el embrión a congelar. E. Cierre hermético con tapón de plástico para pajuelas.

Descongelado de los embriones

Se descongelaron los embriones criopreservados tomando las pajuelas del termo y sacudiéndolas al aire durante 10 seg. Luego se sumergieron durante otros 10 seg en un baño térmico de agua 37 °C. Los embriones descongelados fueron colocados en una solución 0,5M de sacarosa en DPBS durante 5 minutos, posteriormente fueron lavados en tres gotas de 200 µl de medio CSC suplementado con 8mg/ml de BSA y 20% SFB. Finalmente se cultivaron durante tres días en 400 µl de este mismo medio en placas de 4 pocillos (nunc) cubiertas con aceite mineral. El análisis de re-expansión en embrionaria fue realizado a las 24 y 48 h de cultivo del descongelado, observando el número de blastocistos que re expanden en cultivo in vitro.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa GraphPad PRISM® versión 5.0 Software Estadístico. Previamente se evaluaron los supuestos de normalidad (Test de Shapiro-Wilks) junto con la homogeneidad de varianzas (test de Levene) mediante el software Info Satat para su posterior análisis. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas. Se consideraron diferencias significativas con un $p < 0,05$. Cada vez que el ANOVA arrojó un resultado significativo, se aplicó el test de Bonferroni para comparar las medias de los diferentes tratamientos.

Capítulo II

RESULTADOS

Resultados

ETAPA 1: Estandarizar la producción *in vitro* de embriones bovinos de manera convencional y mediante el uso de moduladores de AMPc.

Análisis de maduración ovocitaria

Con el objetivo de estudiar el efecto del uso de diferentes moduladores de AMPc sobre el proceso de maduración *in vitro*, realizamos un tratamiento control con medio de maduración estándar y un tratamiento bifásico, empleando medio suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina, un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas; forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, con el objetivo de aumentar la producción intracelular de AMPc y evitar al mismo tiempo su degradación, produciéndose de esta manera un aumento intracelular del mismo. Seguido de cultivo en cilostamida, molécula encargada de inhibir la actividad de la fosfodiesterasa 3A, proteína específica de ovocitos bovinos. El análisis de maduración fue realizado a las 24 h observando *a priori* la expansión del cúmulo, y luego evaluando presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino.

En la figura 39 se muestran la expansión del cúmulo de ovocitos madurados mediante tratamiento estándar y bifásico. No se observaron diferencias morfológicas por observación a la lupa estereoscópica entre los ovocitos madurados por ambos tratamientos. Los ovocitos maduros MII denudados presentaron citoplasma homogéneo, membrana plasmática intacta, se encontraban rodeados por la zona pelúcida extracelular transparente, y un espacio perivitelino de similar espesor para todos los grupos.

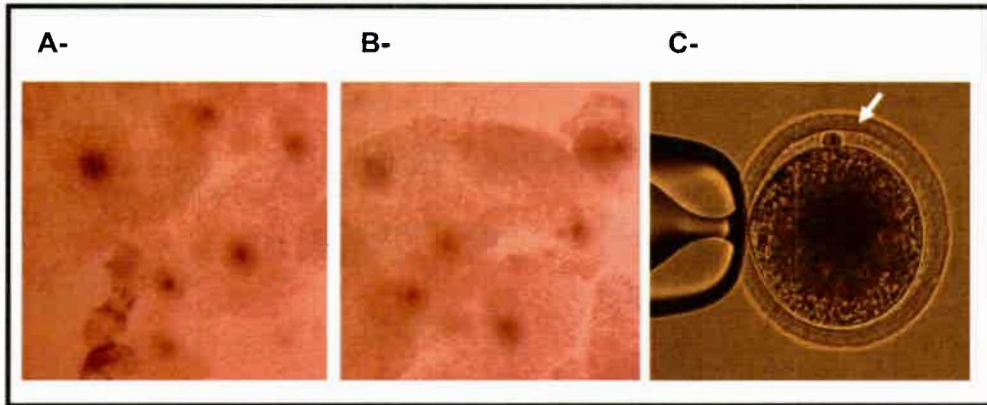


Figura 39. Fotografías de ovocitos madurados in vitro. Se observaron a lupa estereoscópica aumento 10X ovocitos pasadas 24 horas de maduración empleando el protocolo (A) estándar; (B) bifásico; (C). La flecha blanca indica el corpúsculo polar extruido en el espacio perivitelino de un ovocito desnudado, en metafase II producido por maduración bifásica.

Se realizaron 4 pruebas de maduración *in vitro* con un total de 40 ovocitos por ensayo. El porcentaje de maduración promedio para el grupo control fue de 74,75 %, mientras que el promedio de maduración del tratamiento bifásico fue de 76,55 %. La figura 40 muestra los resultados obtenidos. No se encontró diferencia significativa en la eficiencia de maduración ovocitaria para ambos protocolos (*Mann Whitney test* – $P > 0,05$).

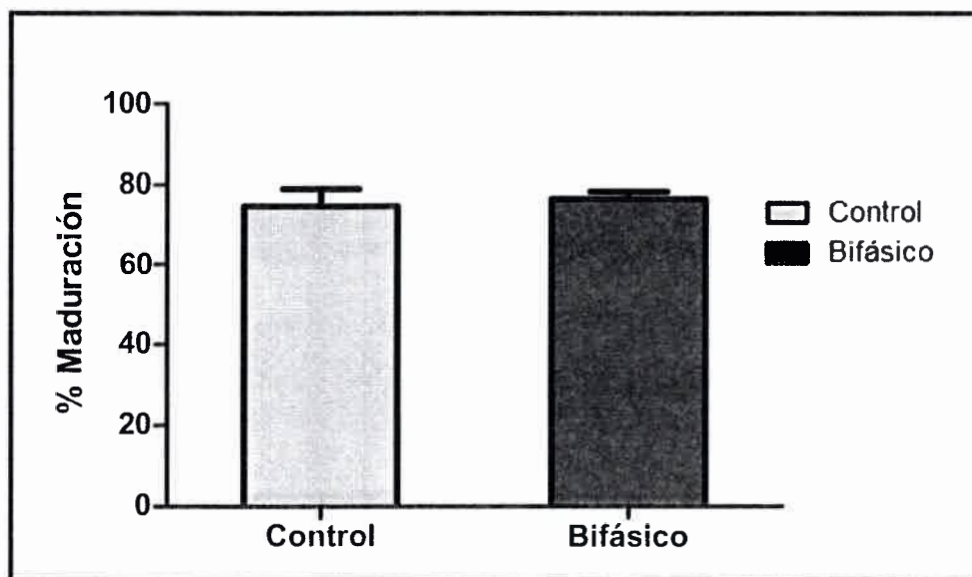


Figura 40. Análisis de maduración ovocitaria. Los gráficos muestran el promedio para cada tratamiento \pm el error estándar. $P > 0,05$. Mann Whitney test. $n=4$

Clivaje embrionario

Se evaluó la capacitación inducida por heparina en espermatozoides criopreservados mediante CTC y se determinó 14,72 % como porcentaje inicial de espermatozoides capacitados en el control (medio IVF-SOF). En los espermatozoides cocultivados en presencia de heparina se observó un aumento significativo del porcentaje de capacitación (23,58 %) de acuerdo a lo esperado. Se realizó el análisis de clivaje embrionario pasadas 48 h de la FIV mediante observación en lupa. Aquellos que presentaban al menos dos células fueron mantenidos en cultivo durante 8 días. Los ovocitos no fertilizados y/o muertos fueron retirados del cultivo para evitar la producción de compuestos tóxicos y/o nocivos para el resto de los embriones que permanecieron en cultivo hasta alcanzar el estadio de blastocisto.

No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las tasas de clivaje de presuntos cigotos derivados de la FIV de ovocitos previamente madurados por tratamiento estándar o bifásico (77,85 y 74,50% respectivamente). Los resultados se muestran en la figura 41.

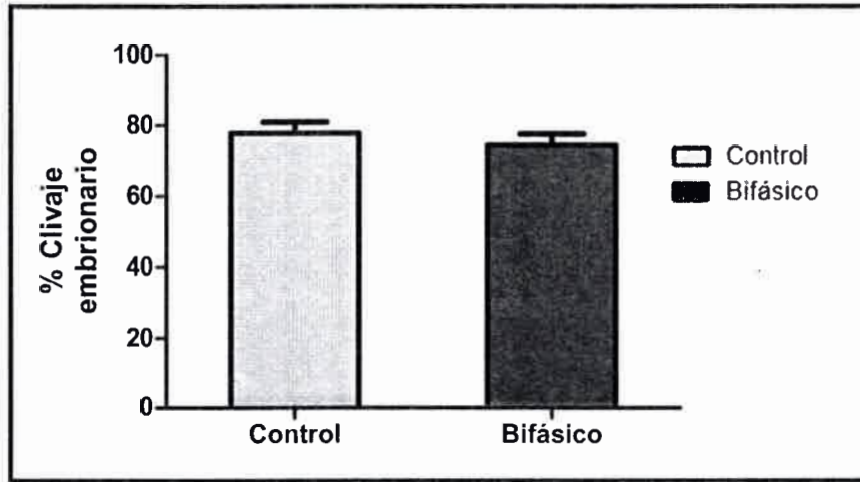


Figura 41. Análisis de tasas de clivaje embrionario de presuntos cigotos. Se muestra el promedio para cada tratamiento \pm el error estándar de ovocitos fecundados. La columna gris se corresponde con el clivaje post-fertilización de ovocitos madurados por protocolo estándar (control), mientras que la columna negra pertenece a ovocitos madurados por tratamiento bifásico seguido de fertilización *in vitro*. $P > 0,05$. T-test Mann Whitney. $n=7$.

Producción embrionaria

En este estudio se produjeron en total 118 blastocistos entre ambos protocolos de maduración (control y bifásico) mediante 7 sesiones de FIV. La producción de embriones fue analizada en los días 7 y 8 de cultivo para ambos tratamientos. Se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en la tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto al día 7 empleando uso de moduladores de AMPc (30,90 %), respecto de la tasa de desarrollo del grupo de ovocitos madurados con el protocolo estándar (21,90%). Este aumento del 9 % respecto del tratamiento control sugiere un efecto positivo y mayor competencia en aquellos ovocitos madurados con el tratamiento bifásico (figura 42).

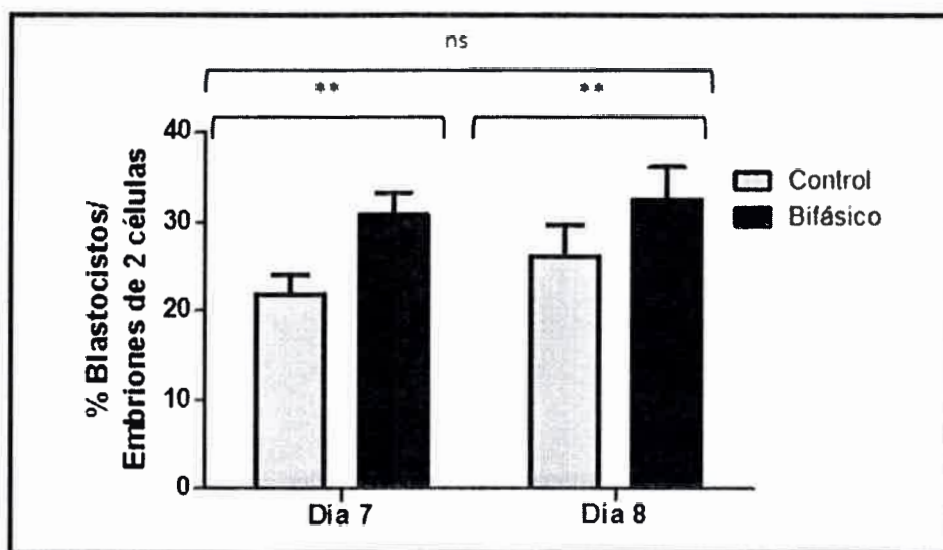


Figura 42. Análisis de producción embrionaria a los días 7 y 8 de cultivo embrionario. Se muestra el promedio para cada tratamiento \pm el error estándar. La columna gris se corresponde con la tasa de blastocistos generados a partir de ovocitos madurados por protocolo estándar (control), mientras que la columna negra pertenece a la tasa de blastocistos de ovocitos madurados por tratamiento bifásico seguido de fertilización *in vitro*. ** $p < 0,01$ n.s. Diferencias no significativas. ANOVA- dos factores de medidas repetidas. Test *a posteriori* Bonferroni. $n=7$.

Se analizó el porcentaje de blastocistos al octavo día de cultivo a fines de estudiar si persisten las diferencias observadas al día 7. Nuevamente se observó que el tratamiento bifásico presentó un porcentaje significativamente mayor respecto del control (32,55 % y 26,25 % respectivamente). La diferencia en la tasa de blastocistos para ambos protocolos disminuyó al 6,3 % en comparación al día anterior. La aparición de blastocistos tardíos en el día 8 indica menor competencia ovocitaria y calidad embrionaria. La figura 43 muestra embriones obtenidos por FIV a partir de ovocitos madurados con el protocolo bifásico.

Adicionalmente, se estudió la interacción entre los protocolos de maduración y el tiempo de cultivo, sin encontrarse diferencias significativas entre dichas variables ($p=0,4675$). Por otro lado, se estudió el efecto de ambos protocolos de maduración en los valores de producción embrionaria, observándose diferencias significativas entre el tratamiento bifásico y el control ($p = 0,0012$). De la misma manera se analizó el efecto

del tiempo en los porcentajes de producción, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos días de cultivo ($p=0,4388$). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la producción de embriones entre los sistemas de maduración utilizados, pero no así entre los diferentes días de cultivo.

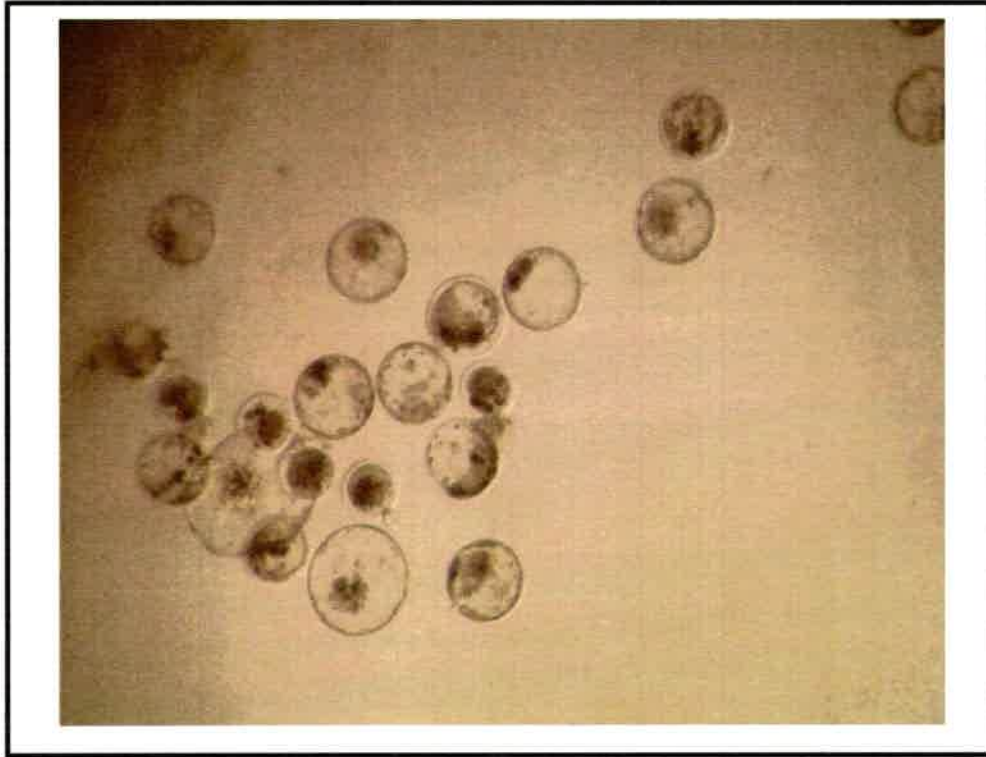


Figura 43. Blastocistos obtenidos por fertilización *in vitro* de ovocitos madurados empleando el tratamiento bifásico. Se muestran blastocistos tempranos, expandidos y uno eclosionado al día 7 post fertilización *in vitro*.

ETAPA 2: Estudiar parámetros de calidad de los embriones producidos por fertilización *in vitro* de ovocitos madurados mediante el tratamiento estándar y el sistema bifásico.

Tasa de eclosión

El análisis de eclosión embrionaria fue realizado al igual que el estudio de producción de embriones en los días 7 y 8 de cultivo. La figura 44 muestra blastocistos

eclosionados obtenidos mediante fertilización *in vitro* de ovocitos madurados empleando el tratamiento bifásico durante este trabajo.



Figura 44. Blastocistos obtenidos por fertilización *in vitro* de ovocitos madurados empleando el tratamiento bifásico. Las flechas blancas muestran tres zonas pelúcidas vacías y a su derecha dos de los blastocistos eclosionados al día 8 post fertilización *in vitro*.

Al día 7 de cultivo el tratamiento bifásico mostró un promedio de eclosión de 25,9 %, mientras que los blastocistos obtenidos mediante el control presentaron una tasa eclosionaría de 2,0 %. A diferencia de los valores obtenidos al día 7, los blastocistos obtenidos mediante el control al día 8 presentaron un promedio de eclosión de 33,85 %, observándose un aumento aproximado de 31,15 % entre ambos días de análisis. El tratamiento bifásico presentó un promedio de eclosión de 46,05 %, obteniéndose un aumento de 20,15 % entre ambos días (ver figura 45).

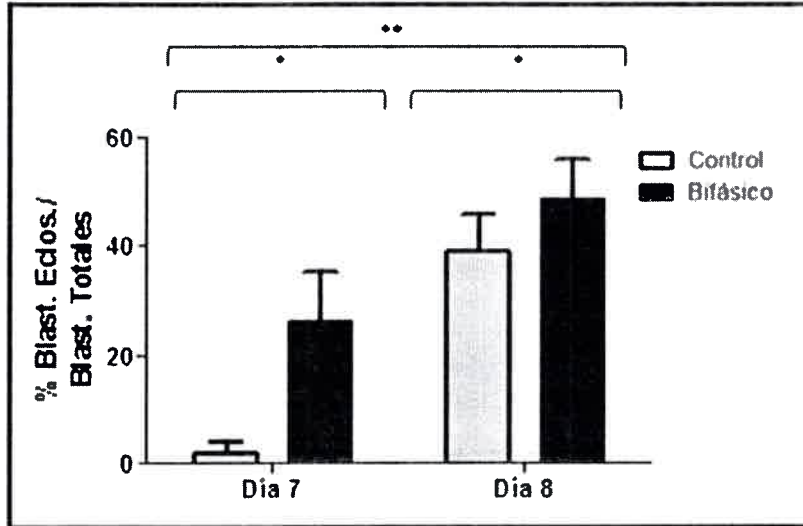


Figura 45. Análisis de eclosión embrionaria. El análisis fue realizado en los días de cultivo 7 y 8. Los gráficos muestran el promedio para cada tratamiento \pm el error estándar. ** < 0,01. * < 0,05. ANOVA-dos factores de medidas repetidas a posteriori Bonferroni. n = 7.

El análisis de interacción entre los protocolos de maduración y el día de eclosión no presentó diferencias significativas entre ambas variables de estudio ($p = 0,2276$), por el contrario, el efecto del tiempo sobre los valores de eclosión mostro diferencias significativas, con una probabilidad menor a 0,01 ($p = 0,007$). De igual manera se estudió el efecto del tratamiento respecto del control, al igual que para el tiempo, se observaron diferencias significativas, aunque estas fueron de un relevancia menor con una probabilidad menor al 0,001 ($p=0,004$). Estos resultados sugieren que el efecto del tiempo y del tratamiento bifásico, tienen una implicancia significativa en las tasas de eclosión, pero no así la interacción entre ambos sistemas de maduración.

Recuento celular en embriones de día 8

Se realizó un análisis cuantitativo referido al número de células en los blastocistos al 8 día de cultivo para estudiar la calidad de los embriones producidos por ambos protocolos. La figura 46 muestra uno de los embriones derivados del tratamiento bifásico analizado.

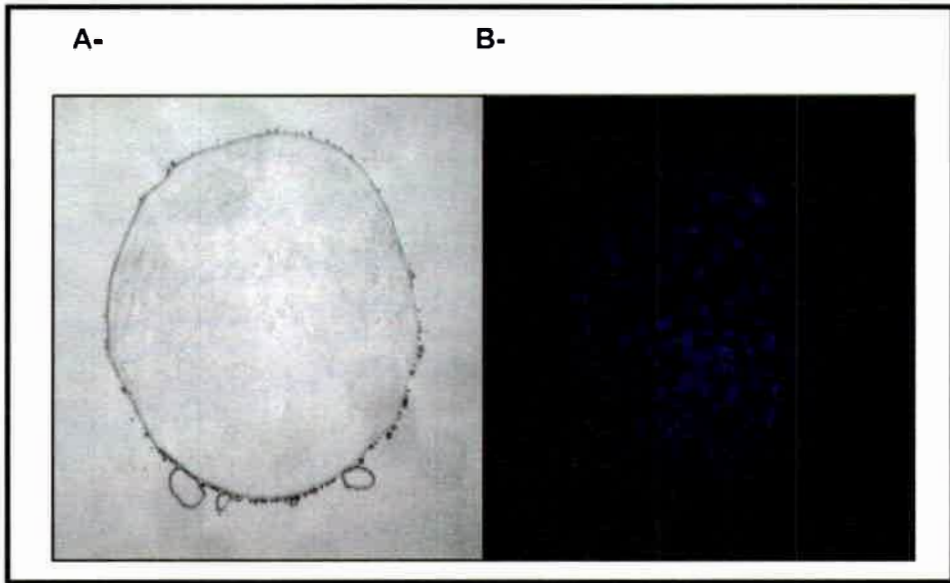


Figura 46. Recuento celular. En la fotografía se muestra uno de los embriones al día 8 derivado del tratamiento bifásico analizado. (A) Imagen a campo claro (B) corresponde al mismo blastocisto visualizado por microscopia de fluorescencia.

Los resultados mostraron diferencias significativas ($P=0,0268$) en el promedio celular por blastocisto, en embriones obtenidos a día 8 derivados del tratamiento control y el tratamiento bifásico (106,15 células/blast. y 163,85 células/blast. respectivamente). Los resultados se muestran en la figura 47.

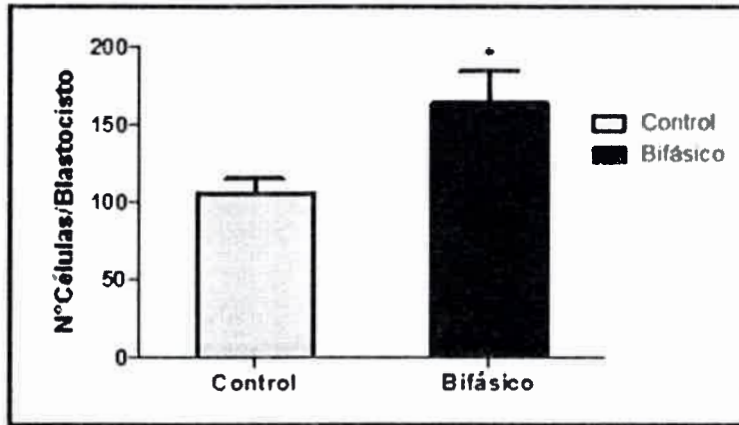


Figura 47. Análisis de número de células por embrión. Los gráficos muestran el número de células promedio por embrión para cada tratamiento \pm el error estándar. Se realizaron 2 réplicas de 4 blastocistos cada una * $< 0,05$. T- test- Mann Whitney test.

Criotolerancia embrionaria

Se analizaron los niveles de recuperación embrionaria de blastocistos obtenidos mediante FIV post-criopreservación a las 24 h y 48 h del descongelado. Estos embriones fueron producidos a partir de ovocitos madurados tanto en presencia de los moduladores de AMPc, como en ausencia de los mismos. Los resultados se muestran en la figura 48.

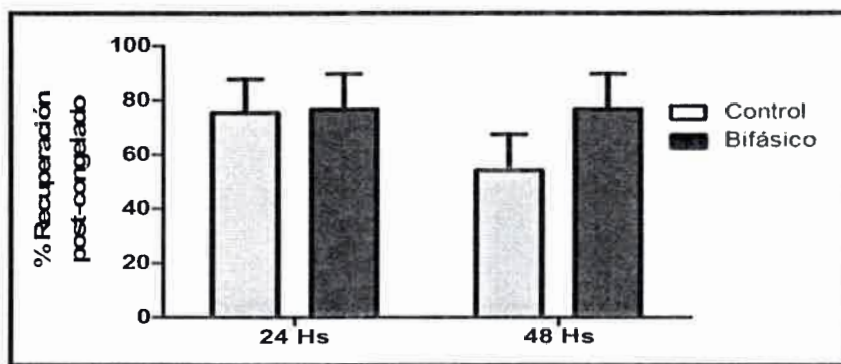


Figura 48. Análisis de re expansión embrionaria post-criopreservación. El análisis fue realizado a las 24 y 48 h del descongelado de los embriones. Los gráficos muestran el promedio para cada tratamiento \pm el error estándar. ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Posterior corrección por Bonferroni. $n = 3$.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de recuperación embrionaria post-criopreservación entre el tratamiento bifásico y el control, tanto a las 24 h como a las 48 h. De la misma manera, no se observó relación significativa en los niveles de recuperación entre el tratamiento bifásico y el control ($P=0,4283$), el tratamiento bifásico no presentó diferencias significativas respecto del control en los niveles de recuperación entre ambos días de análisis (76,66 % y 75,33 % a las 24 h de observación y 76,66 % 54,11 % a las 48 h respectivamente) con una probabilidad de 0,3777. El día de estudio no mostró una inferencia significativa en los niveles de blastocistos recuperados ($P = 0,4853$).

Capítulo II

DISCUSIÓN

Discusión

La eficiencia aproximada en los sistemas de producción *in vitro* en bovinos empleados en la actualidad representa entre 20 - 30 % de blastocistos transferibles referidos al total de ovocitos iniciales. Por todo esto se busca exhaustivamente aumentar las tasas de desarrollo y de calidad embrionaria, tratando de generar embriones lo más similares posible a los obtenidos en los sistemas *in vivo*. Durante este capítulo se lograron producir 174 blastocistos, de los cuales, 56 fueron obtenidos por activación química (datos no presentados) y 118 entre protocolos de maduración (control y bifásico) mediante fertilización *in vitro*. La tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto al día 7 empleando uso de moduladores de AMPc (30,90 %), respecto de la tasa de desarrollo del grupo de ovocitos madurados con el protocolo estándar (21,90%). Este aumento del 9 % respecto del tratamiento control sugiere un efecto positivo y mayor competencia en aquellos ovocitos madurados con el tratamiento bifásico. Asimismo, se sabe que la calidad de los embriones producidos por biotecnologías de producción, fertilización *in vitro*, ICSI y transferencia nuclear de células somáticas, es inferior en comparación con su contrapartida *in vivo* (Niemann y col., 2002).

Reportes previos demostraron que el uso de moduladores de AMPc es capaz de evitar y/o retrasar el reinicio prematuro de la maduración tanto en ovocitos bovinos como en otras especies (Rose y col., 2013; Thomas y col., 2002; Tsafirri y col., 1996). Luego, la hormona folículo estimulante activa e induce la cascada de señalizaciones del AMPc, favoreciendo de esta manera la expresión de péptidos con acción similar al EGF. Estos péptidos son producidos por las células del cúmulus que rodean al ovocito, favoreciendo el proceso de maduración en los mismos (Albuz y col., 2010; Downs & Chen, 2008).

La primera etapa de este capítulo consistió en estudiar el efecto de los moduladores de AMPc en la producción *in vitro* de embriones bovinos. Para esto nos basamos en un tratamiento de maduración bifásico, ensayado previamente en murinos y bovinos por Albuz y col., (2010) aunque con ligeras modificaciones. Brevemente, nosotros trabajamos con medio de maduración que presenta SFB en una concentración

del 10%, y este medio fue empleado en todos los experimentos a diferencia de los grupos de Albuz y Ulloa, cuyo estudio fue realizado íntegramente en ausencia de SFB.

En nuestro ensayo, mediante el tratamiento bifásico perseguimos regular y/o sincronizar la maduración ovocitaria en dos fases; en la primera fase de 2 horas, generamos un rápido aumento en los niveles de AMPc del interior ovocito empleando 3-isobutil-1-metilxantina y forskolina (PRE-MIV), y en la segunda fase de 24 horas de MIV propiamente, se busca evitar la degradación del AMPc producido anteriormente mediante el uso de cilostamida. La segunda fase se realizó en presencia de la hormona FSH, la cual como es conocido tiene un efecto clave en el reinicio de la división meiótica durante la maduración ovocitaria. Otros autores emplearon ACi para incrementar la concentración intracelular de AMPc, y así aumentar las tasas de maduración ovocitaria (Guixue y col., 2001). En ese caso es necesario adecuar las concentraciones de ACi, ya que cantidades insuficientes, o excesivas de esta molécula, podrían producir un arresto no reversible en la maduración del ovocito. En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas en las tasas de maduración de los ovocitos madurados por protocolo control y bifásico (74,75 % y 76,55 % respectivamente). Contrariamente con este estudio Albuz y col., 2010 observaron una disminución en los niveles de maduración mediante el uso de moduladores de AMPc luego de 24 h de MIV, por lo cual, según estos autores, con un periodo de maduración extendido de 30 h se logra aumentar el número total de ovocitos en el estadio de MII. Sin embargo, nuestros hallazgos coinciden con el reporte de Ulloa y col., 2014, en la misma especie, donde no se observaron tasas diferentes de maduración entre el grupo de ovocitos control (madurados durante 24 horas con un protocolo estándar); y el grupo tratado con los mismos moduladores de AMPc, pero con un tiempo total de MIV de 30 h ($79,8 \pm 4,3\%$ vs $74,5 \pm 4,4\%$ respectivamente). De esta manera mediante la aplicación del tratamiento bifásico, se pudieron obtener valores de maduración congruentes con los controles y los resultados presentados por otros grupos, sin la necesidad de tener que aumentar los tiempos de cultivo *in vitro*.

Teniendo en cuenta que el uso de los moduladores de AMPc durante el proceso de maduración ovocitaria no influyó significativamente sobre el número de ovocitos en MII (con extrusión del primer corpúsculo polar); se decidió estudiar el efecto directo del

Capítulo II. Discusión

tratamiento bifásico en las tasas de clivaje embrionario en presuntos cigotos generados por fertilización *in vitro*. La influencia que ejerce la calidad del ovocito en el potencial desarrollo embrionario es fundamental en bovinos más que en alguna otra especie (Sirard y col., 2006). Previo a la activación del genoma embrionario, ARN mensajeros y proteínas se sintetizan en el ovocito durante el crecimiento y maduración, los cuales contribuyen con el desarrollo embrionario temprano (Warzych y col., 2007). Nuevamente, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento bifásico (77,85 % y 74,50 % respectivamente), es decir, que el uso de moduladores no tiene una acción directa sobre la tasa de clivaje de los presuntos cigotos puestos en cultivo embrionario. Se debe tener en cuenta que dada la ausencia de diferencias significativas en los niveles de maduración ovocitaria entre ambos grupos., la relación de ovocitos factibles de ser fecundados es estadísticamente similar entre el grupo control y el tratado. Los resultados obtenidos en este trabajo, en referencia a los niveles de clivaje embrionario, se contradicen con publicaciones previas realizados por Luciano y col., 1999, donde se plantea una combinación de moduladores de AMPc capaz de producir un aumento estadísticamente significativo en las tasas de clivaje embrionario. Sin embargo, nuevamente nuestros resultados se condicen con lo observado por Albuz y col., 2010 luego de un período de 24 h de maduración, aunque, según dichos autores, el mismo análisis empleando un período de maduración de 30 h reporta un aumento de los valores de clivaje. Ulloa y col., 2014 tampoco observaron cambios significativos en las tasas de clivaje embrionario en el grupo madurado por 24hs. Esta ausencia de diferencias significativas, entre el control y el uso de moduladores de AMPc, también fue observadas por Rose y col., 2013 en la especie ovina. A raíz de los resultados obtenidos, podemos decir que el uso de los moduladores de AMPc no tendría relación directa en la interacción espermatozoide-ovocito, hecho que se evidencia en la ausencia de cambios significativos en las tasas de clivaje obtenidas entre en el control y el tratamiento bifásico, aunque faltarían estudios complementarios de fecundación que ratifiquen esta hipótesis.

El objetivo principal de esta etapa se focalizó en estudiar el efecto que los moduladores podrían tener en la producción *in vitro* de embriones por FIV. El análisis de desarrollo embrionario mostro un aumento en la producción por parte del tratamiento

bifásico respecto del control, tanto a día 7 como a día 8 de cultivo. El análisis realizado luego de 7 días de cultivo informo que el tratamiento bifásico generó un aumento del 9 % en la producción de embriones respecto del control (30,90 % y 21,90 % respectivamente), mientras que al día 8 la diferencia entre el tratamiento bifásico y el control fue menor, cercana al 6,3 % (32,55 % y 26,25 % respectivamente). Las diferencias de producción embrionaria obtenidas en este trabajo, se correlacionan con los resultados publicados por Albus y col.,aboradores, aunque ellos determinan la tasa de blastocistos al día solamente. Si bien los mismos autores también observan un incremento en los niveles de producción cuando se fertilizaron ovocitos madurados a las 24 h, ellos observaron un mayor incremento en los niveles de producción cuando se fertilizaron ovocitos madurados con tratamiento bifásico durante 30 h previos a la FIV. Otros estudios reportaron que es posible aumentar la producción de embriones mediante la sola utilización de inhibidores de PDE-3, específicamente Milrinona si los ovocitos son madurados mínimamente por un periodo de 28 h (Thomas y col., 2004). Por otro lado, nuestros resultados se contradicen con lo observado por Ulloa, donde muestran que el uso de moduladores de AMPc durante el proceso de maduración, produce una disminución en los niveles de producción embrionaria.

Las diferencias observadas en la producción de blastocistos a los días 7 y 8 de cultivo entre el control y el tratamiento bifásico (9 % y 6,3 % respectivamente), ponen en manifiesto que el uso de moduladores de AMPc genera un aumento en la cinética de desarrollo embrionario, debido a que la mayor parte de los blastocistos pudieron ser visualizados al séptimo día de cultivo, mientras que en el control el mayor número de embriones se evidenció al día 8. Esta característica podría relacionarse con la producción de embriones de mejor calidad, ya que como hemos mencionado anteriormente, un aumento en la cinética o “*timing*” de desarrollo embrionario puede ser utilizado como un indicador y/o marcador de calidad embrionaria (Holm y col., 2002, Lonergan y col., 2003). Una característica que no pudo ser estudiada cuantitativamente en este trabajo, fue el desarrollo embrionario a diferentes días de cultivo, debido a que la observación diaria de los embriones impacta negativamente en el desarrollo de los mismos y el principal objetivo fue el estudio de blastocistos en los días 7 y 8 de cultivo.

Aunque la mayoría de los trabajos hacen mención a una mejora en la producción embrionaria mediante el uso de moduladores de AMPc en especies de interés científico-comercial como la bovina (Thomas y col., 2004; Albuz y col., 2010; Bilodeau-Goeseels y col., 2011; Li y col., 2012 ; Ulloa y col., 2014), un trabajo presentado en la especie ovina no mostró cambios significativos en la producción de embriones en sistemas de producción *in vitro* (Rose y col., 2013) .

En la segunda etapa de este capítulo, nos propusimos estudiar diversos parámetros de calidad embrionaria. El análisis de clivaje embrionario, se observó cualitativamente que pasadas 24 h de cultivo, es decir 48 h de comenzada la FIV el tratamiento bifásico presentó un número mayor de embriones de 4 células en comparación con el control donde la mayoría de los embriones se encontraba en 2 células. Este aumento en la cinética de clivaje, podría estar relacionado con una mayor producción y estabilidad de transcriptos poli-adenilados junto con un incremento en los niveles de transcripción. Estos eventos se encuentran estrechamente ligados al proceso de maduración ovocitaria y suelen presentar falencias si el reinicio de la meiosis ocurre de manera prematura (Lonergan y col., 2003). De esta manera y teniendo en cuenta los resultados observados, se podría relacionar el aumento en los niveles de producción embrionaria por parte de tratamiento bifásico con una mejora en la competencia ovocitaria producida durante el proceso de maduración *in vitro*.

Realizamos el análisis de blastocistos eclosionados en cultivo, debido a que los embriones producidos de manera *in vitro* suelen presentar falencias en el proceso de eclosión, permitiendo esta característica para ser utilizada como un sistema de selección y marcador de calidad embrionaria (Chimote y col., 2013; Van den Abbeel y col., 2013). Se pudo observar que el tratamiento bifásico generó un aumento significativo en los niveles de eclosión embrionaria, estas diferencias se encontraron relacionadas, tanto, con el protocolo de maduración como el día de estudio, obteniendo un valor de eclosión promedio para el tratamiento bifásico de 25,90 % al día 7 de y 46,05 % al día 8. Mientras que para el control se obtuvo un promedio de eclosión de 1,70 % al día 7 y 33,85 % al día 8 de cultivo. Estos resultados no solo demuestran que el tratamiento bifásico produce un aumento en el número de blastocistos eclosionado, sino también, presentan un incremento en la cinética de eclosión respecto del control. Un aumento en

los niveles de blastocistos eclosionados es de gran importancia en la producción de *in vitro* embriones. Diversos autores, han reportado que la transferencia de blastocistos eclosionados o en proceso de eclosión es capaz de aumentar la tasa de preñez a día 30 (Chimote y col., 2013; Khorram y col., 2000; Yoon y col., 2001) y la transferencia de estos, también es capaz de producir un incremento en los niveles de implantación posteriores y en los valores de natalidad (Chimote y col., 2013). A su vez, la utilización de blastocistos eclosionados favorece el proceso de congelamiento debido al gran tamaño que estos embriones presentan frente a los blastocistos expandidos (Min y col., 2013) y permite la remoción del líquido blastocélico para posterior criopreservación, esto es una gran ventaja ya que los blastocistos bovinos obtenidos por FIV o SCNT presentan una mayor resistencia al congelado (Min y col., 2013). A raíz de lo mencionado, un aumento en el número de blastocistos eclosionados nos permitiría seleccionar embriones de mejor calidad, pudiendo aumentar de esta manera, las tasas de preñeces, los futuros nacimientos y la posibilidad de congelar embriones para su posterior utilización.

Por otro lado, se decidió estudiar el promedio de células que componía a los embriones, para esto, se utilizaron blastocistos de día 8 provenientes de ambos tratamientos. Estos embriones fueron fijados, teñidos, montados y observados al microscopio de fluorescencia. Los blastocistos obtenidos mediante el control mostraron un promedio de 106,15 células/embrión, mientras que los blastocistos producidos mediante el tratamiento bifásico presentaron un promedio de 163,85 células/embrión, observándose diferencias significativas entre en número de células de ambos protocolos de maduración. Las diferencias obtenidas en este trabajo concuerdan con los resultados publicados por Albuz (Albuz y col., 2010), donde los autores observaron que la utilización de moduladores de AMPc produjo embriones con un promedio de 184 células/embrión, mientras para el control el promedio fue de 135 células/embrión. El número de células por embrión correspondiente al tratamiento bifásico fue cercano al número de células que poseen los embriones producidos *in vivo* según la bibliografía, aunque este número puede variar dependiendo el trabajo estudiado. El patrón de aumento observado, mediante la utilización de moduladores de AMPc, también fue visto en ratones (Albuz y col., 2010) y en la especie ovina (Rose y col., 2013). El

aumento en el número de células por embrión mediante la aplicación del tratamiento bifásico sugiere un incremento en la calidad de los embriones producidos. Varios autores han reportado que un aumento en el número de células/embrión favorece la supervivencia de los embriones en cultivo, la resistencia a la criopreservación y es capaz de producir un aumento en las tasas de preñeces (Koo y col., 2002; Ushijima y col., 2008; Albuz y col., 2010).

Finalmente, se sabe que la criopreservación de embriones nos permite suplir las falencias temporales que sufren los embriones frescos en sus transportes (Ha y col., 2014). Con el fin de estudiar si el uso de moduladores de AMPc durante el proceso de maduración favorecía la resistencia a la criopreservación, realizamos una curva de congelamiento de descenso lento de temperatura. Un estudio publicado en el año 1985 por Farrand (Farrand y col., 1985), demostró que la criopreservación mediante el descenso lento de temperatura, con una temperatura final de -33°C a -38°C previo al almacenado en nitrógeno líquido, favorecía la criotolerancia de los embriones (Farrand y col., 1985). Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó el congelado de los embriones hasta una temperatura de -35°C , para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido, estudiando, los porcentajes de recuperación a las 24 h y 48 h. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los niveles de recuperación embrionaria, entre blastocistos producidos en el control y en el tratamiento bifásico, obteniendo valores de recuperación a las 24 h de 75,33 % y 76,66 % respectivamente y 54, 11 % y 76,66 % a las 48 h. No existe bibliografía publicada que informe o estudie la respuesta al congelamiento de blastocistos obtenidos mediante la utilización de moduladores de AMPc, lo cual limita el análisis de los resultados obtenidos. Un trabajo publicado por Sanches y col., (2013) menciona que la Forscolina, uno de los moduladores utilizados durante la maduración bifásica, puede usarse como agente lipolítico, es decir, removiendo lípidos de las membranas celulares y favoreciendo así el proceso de criopreservación y su posterior recuperación. En este trabajo, la utilización de Forscolina no produjo cambios significativos en los niveles de recuperación embrionaria, como tampoco, en los porcentajes de eclosión, mostrando en contraposición un aumento en la tasas de preñeces (Sanches y col., 2013). La disminución observada en los porcentajes de criotolerancia podría deberse a la toxicidad

de los crioprotectores presentes en el medio de congelación (Farrand y col., 1985; Ha y col., 2014; Vajta & Kuwayama, 2006).

Concluimos que es posible estudiar el efecto en la producción embrionaria de tres moduladores AMPc (Forskolina, IBMX y Cilostamida), estandarizando de esta manera, un sistema de maduración bifásico el cual puede ser usado de manera alternativa a la maduración convencional implementada de rutina en el laboratorio, pudiendo ser aplicado a sistemas de producción animal. El tratamiento bifásico no presentó diferencias significativas en las tasas de clivaje embrionario, como así tampoco en los niveles de maduración respecto del control. Adicionalmente, se demostró un aumento significativo en los niveles de producción embrionaria. A su vez, el sistema de maduración bifásico tiene como consecuencia la producción de embriones con mejores parámetros de calidad respecto del control, ya que los blastocistos producidos mediante la utilización de los moduladores de AMPc presentaron un *timing* de desarrollo embrionario mayor, una cinética de eclosión más elevada y un aumento en el número de células por embrión. En contraposición, el sistema bifásico no generó diferencias significativas en los valores de recuperación de aquellos embriones congelados. Una posible causa sería que el tratamiento no presente ninguna ventaja o desventaja respecto al control, aunque se debe tener en cuenta el reducido número de embriones analizados en este ensayo, lo que podría quitarle robustez al análisis estadístico realizado. A pesar de las potenciales ventajas de la maduración bifásica en términos de productividad y calidad embrionaria, no fue posible realizar estudios de preñez que nos permitan ver como afectaría este tratamiento la implantación y en el desarrollo de los fetos.

El sistema de maduración bifásico es relativamente simple, y a su vez puede ser aplicado en diversas especies de interés zootécnico como la bovina, y la equina, entre otras; con la particularidad de que cada especie posee su concentración específica de moduladores, y la utilización inadecuada de estos puede ser nociva para producción de embriones. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y la bibliografía reportada, podemos concluir que el uso de moduladores de AMPc durante la maduración *in vitro* mejora la competencia ovocitaria, aspecto que se ve reflejado en un aumento en la producción y la calidad de los embriones producidos. Este sistema de maduración puede ser implementado en diversas técnicas de interés comercial como son

la ICSI y clonación por TNCS, ambos procesos donde la competencia del ovocito juega un rol clave en el desarrollo de los embriones. Asimismo, estudios complementarios sobre maduración de ovocitos bovinos pueden ser muy interesantes sirviendo como modelos de MIV en tratamientos de infertilidad en humanos, dada la alta similitud respecto del desarrollo embrionario de embriones bovinos y humanos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Se logró estandarizar la producción embrionaria a partir de ovarios de faena, por activación química, fertilización in vitro, transferencia nuclear de células somáticas e Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

La transgénesis mediada por la meganucleasa I-SceI aumenta significativamente la integración al azar de ADN exógeno en fibroblastos fetales bovinos en cultivo, favoreciendo la obtención de líneas celulares transgénicas. Se produjeron embriones por transferencia nuclear de células somáticas a partir de fibroblastos fetales transfectados por un sistema mediado por enzimas de restricción.

Se generaron también líneas de fibroblastos que expresan constitutivamente la endonucleasa I-SceI las cuales serán transfectadas con un vector portando el transgén (I-SceI-pBSII-SK+ZsGreen1+Neo) flanqueado por sitios de restricción para I-SceI. Se cree que éstas líneas serán muy útiles como modelo para estudiar el efecto de las endonucleasas sobre la eficiencia de integración de ADN heterólogo en células bovinas en cultivo.

La transgénesis mediada por la meganucleasa I-SceI no fue capaz de generar mayor proporción de embriones bovinos transgénicos como lo observado en anfibios (*Xenopus*, tritones) y en peces.

La inyección con la mezcla de digestión del transgén por la meganucleasa no compromete la viabilidad embrionaria. La meganucleasa introduce rupturas doble cadena altamente recombinogénicas a ambos lados del inserto de interés, y lo protegería frente a la degradación por nucleasas.

Alternativamente, se procedió a inyectar ovocitos MII previo a la FIV con mezcla de digestión de la meganucleasa, lo que resultó en bajas tasas de clivaje y de desarrollo embrionario, posiblemente debido a la excitosis prematura de gránulos corticales en respuesta a la inyección

Con el objetivo de descartar la posible generación de embriones partenogénicos producto de la asistencia química en nuestros embriones generados por ICSI, se puso a punto en nuestro laboratorio, un nuevo protocolo de sexado. Diagnóstico genético preimplantacional empleando líquido blastocélico como muestra

de amplificación demostrándose asimismo la existencia de ADN libre en el fluido blastocélico..

Se pudo estudiar el efecto en la producción embrionaria de tres moduladores de AMPc distintos (Forscolina, IBMX y Cilostamida). El uso de moduladores de AMPc favoreció la producción de embriones, mostrando a su vez, un aumento en la cinética de desarrollo respecto del control.

El tratamiento bifásico presentó mayores tasas de eclosión embrionaria y un mayor número de células por embrión respecto del control.

No se observaron cambios significativos en los valores de recuperación embrionaria pos congelado respecto del control.

La utilización de moduladores de AMPc durante la maduración in vitro mejora la competencia ovocitaria, aspecto que se ve reflejado en un aumento en la producción y la calidad de los embriones obtenidos.

PERSPECTIVAS

Perspectivas

Se pretende a futuro trabajar con herramientas para la modificación genética sitio específico de células donantes en TNCS, tales como CRISPR/Cas9. Estas mismas endonucleasas pueden ser inyectadas en el citoplasma de presuntos cigotos bovinos sin necesidad de emplear marcadores de selección, ni correr el riesgo de la integración de material que pueda comprometer el desarrollo embrionario temprano. Asimismo, se continuará con ensayos de hibridación in situ de sondas fluorescentes y de Real Time PCR para poder dilucidar integración y número de copias del transgén en los embriones generados por ICSI y TNCS.

Establecer preñeces en receptoras sincronizadas, estudiando las posibles diferencias entre la maduración convencional y el tratamiento bifásico.

Cuantificar y comparar los niveles de AMPc en los ovocitos cultivados mediante ambos sistemas de producción.

Producir embriones por inyección intracitoplasmática de espermatozoides a partir de ovocitos madurados mediante el tratamiento bifásico y el sistema de maduración convencional.

Estudiar, mediante PCR en tiempo real, el estrés generado en los embriones producidos mediante ambos sistemas de maduración y mediante ICSI-SMGT mediado por enzimas de restricción.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG and Gilchrist RB (2010). Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*, 25(12), 2999–3011.
- Alonso-González L, Couldrey C, Meinhardt MW, Cole SA, Wells DN, Laible G (2012).
- Al-Shawi R, Kinnaird J, Burke J, Bishop JO (1990). Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Mol Cell Biol*; 10: 1192-1198.
- Arias ME, Sánchez R, Risopatrón J, Pérez L, Felmer R (2014). Effect of sperm pretreatment with sodium hydroxide and dithiothreitol on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev*; 26(6):847-54
- Baldassarre, H., B. Wang, N. Kafidi, C. Keefer, A. Lazaris and C. N. Karatzas (2002). "Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies." *Theriogenology* ;57(1): 275-84.
- Belascoain M, Díaz E and Soledad H. (2010). Técnicas para la criopreservación de embriones bovinos. In *Trabajo final-IRAC* (pp. 1–19).
- Bevacqua RJ, Canel NG, Hiriart MI, Sipowicz P, Rozenblum GT, Vitullo A, Radrizzani M, Fernandez Martin R, Salamone DF(2013). Simple gene transfer technique based on I-SceI meganuclease and cytoplasmic injection in IVF bovine embryos. *Theriogenology*.15;80(2):104-13.e1-29
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. *Annu Rev Genet* 2011; 45:273-297.
- Bilodeau-Goeseels S (2003). Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*, 60(9), 1679–1690.
- Bilodeau-Goeseels S (2011). Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in

- the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 78(10-11), 734–43.
- Bilodeau-Goeseels S (2012). Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 47(4), 687–93.
- Birnstiel ML, Busslinger M (1989). Dangerous liaisons: spermatozoa as natural vectors for foreign DNA? *Cell*; 57:701-702.
- Bordignon, V., R. Keyston, A. Lazaris, A. S. Bilodeau, J. H. Pontes, D. Arnold, G. Fecteau, C. Keefer and L. C. Smith (2003). "Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from *in vitro*-transfected somatic cells." *Biol Reprod* 68(6): 2013-23.
- Bosch P, Hodges CA, Stice SL (2004). Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotechnologia Aplicada*; 21: 128-136.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H (1971). Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 68(2):353–7.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD (1989). No simple solution for making transgenic mice. *Cell* ;59:239-41.
- Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie and I. Wilmut (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line." *Nature* 380(6569): 64-6.
- Campos VF, Komninou ER, Urtiaga G, de Leon PM, Seixas FK, Dellagostin OA, Deschamps JC, Collares T (2011). NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology*. 75(8):1476-81.
- Cánepa MJ, Ortega NM, Monteleone MC, Mucci N, Kaiser GG, Brocco M, Mutto AA. "Expression profile of genes as indicators of developmental competence and quality of *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos". *Plos One*; 9(9): e108139.

- Celebi C, Guillaudeau T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V, Jegou B (2003). The making of "transgenic spermatozoa". *Biol Reprod*; 68:1477-1483.
- Celebi C, Auvray P, Benvegna T, Plusquellec D, Jégou B, Guillaudeau T (2002). Transient transmission of a transgene in mouse offspring following *in vivo* transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev.* Aug;62(4):477-82.
- 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 (2002). Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol* ; 2:5.
- Chimote NM, Chimote NN, Nath NM, Mehta BN (2013). Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(3), 183–8.
- Cibelli JB, SL Stice, PJ Golueke, JJ Kane, J Jerry, C Blackwell, FA Ponce de Leon, JM Robl. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *nat Biotechnol* 16, 642-646.
- Clark AJ, Burl S, Denning C, Dickinson P (2000). Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res* ; 9: 263-275.
- Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C, Louvard D, Jaisser F (1998). I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*; 18: 1444-1448.
- Collares T, Campos VF, De Leon PM, Cavalcanti PV, Amaral MG, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK (2011). Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N,N-dimethylacetamide. *J Biosci.* ;36(4):613-20.
- Conti M, Andersen C B, Richard F, Mehats C, Chun S Y, Horner K, Tsafiriri A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 153–9.
- cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12889–12894.
- Cyranoski D (2003). Koreans rustle up madness-resistant cows. *Nature*; 426: 743.

- Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, R. J. and D. R (1996). Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev*, 45(4): 521.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, y col.,(2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13734–13738.
- Denning C, Priddle H (2003). New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction*; 126: 1-11.
- DiLuigi A, Weitzman VN, Pace MC, Siano LJ, Maier D and Mehlmann LM (2008). Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. *Biology of Reproduction*, 78(4), 667–72.
- Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery (2006). *Gene Ther.* ;13(4):283–287.
- Downs SM., Schroeder AC & Eppig, JJ (1986). Developmental capacity of mouse oocytes following maintenance of meiotic arrest in vitro. *Gamete Research*, 15(4), 305–316.
- Edwards, R. G. (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349–351.
- Eppig JJ & Downs SM (1984). Chemical Signals that Regulate Maturation. *Biol Reprod*, 30,1–11.
- Eyestone WH (1999). Production and breeding of transgenic cattle using in vitro production technology. *Theriogenology*, 51:509-517.
- Fahning, M. L., García M. A (1992). Status of Cryopreservation of Embryos Animals. *Cryobiology*, 29(1), 1-18.
- Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*. 1995 Dec;42(4):437-42.

- Farrand, G.D, Elsdon, R.P & Seidel., G.E. (1985). Effect of Slow Cooling End Point Temperature on Survival of Frozen Bovine Embryos. *Journal of Animal Science*, 61(2), 460–465.
- Ferreira EM., Vireque, Adona P R, Meirelles FV, Ferriani R, and Navarro PS (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836–48.
- Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Eser S, Rezaei N, Cui X, Kurome M, Zakhartchenko V, Kessler B, Wieland H, Rottmann O, Schmid RM, Schneider G, Kind A, Wolf E, Saur D, Schnieke A (2012). A porcine model of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. Nov;143(5):1173-5.e1-7.
- Forcato DO, Olmos Nicotra MF, Ortega NM, Alessio AP, Fili AE, , Rodriguez N, Bosch P (2012). “Optimization of branched 25 kda polyethylenimine for efficient gene delivery in bovine fetal fibroblasts”. *Reproduction, Fertility and Development* 25(1) 313-313
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995). Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analyses. *Molecular Reproduction and Development* (40): 233-241.
- Gagne MB, Pothier F, Sirard MA (1991). Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev* ;29:6 –15.
- García-Vázquez FA, Ruiz S, Matás C, Izquierdo-Rico MJ, Grullón LA, De Ondiz A, Vieira L, Avilés-López K, Gutiérrez-Adán A, Gadea J (2010). Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction.*;140(2):259-72.
- Graham y col.,(2003).System for production of helper dependent adenovirus vectors based on use of endonucleases. Patente
- Guixue Z, Luciano A, Coenen K. and Sirard M (2001). The influence of camp before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence, 1733–1743.

- Ha AN, Park HS, Jin JI, Lee SH y col., (2014). Postthaw survival of in vitro-produced bovine blastocysts loaded onto the inner surface of a plastic vitrification straw. *Theriogenology*, 81(3), 467–73.
- Hacein-Bey-Abina S, y col., (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* ;346(16):1185–1193.
- Hasty P, Abuin A, Bradley A. Gene targeting, principles, and practice in mammalian cells (1999). In: Joyner AL (ed.) Gene targeting. *New York: Oxford University Press Inc*: 1-35.
- Hayflick L. (1965). "The Limited *in vitro* Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Experimental cell research* 37: 614-636.
- Herrera C, Morikawa MI, Baca Castex C, Pinto MR, Ortega NM, Fanti T, Garaguso R, Franco MJ, Castañares M, Castañeira C, Losinno L, Miragaya MH, Mutto AA (2015). "Blactocoele fluid from *in vitro* and *in vivo* produced equine embryos contain nuclear DNA". *Theriogenology* ;83(3):415-20.
- Hoelker M, Mekchay S, Schneider H, Bracket BG, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Gilles M, Rings F, Griese J, Schellander K. (2007) Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: effect of transfection reagent and DNA architecture. *Theriogenology*. Apr 1;67(6):1097-107.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2004). Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod*; 71: 405-409.
- Hofmann, A., B. Kessler, S. Ewerling, M. Weppert, B. Vogg, H. Ludwig, M. Stojkovic, M. Boelhauve, G. Brem, E. Wolf, y col., . (2003). "Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors." *EMBO Rep* 4(11): 1054-60.
- Holm, P., Booth, P. J., & Callesen, H. (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction (Cambridge, England)*, 123(4), 553–65.



- Holmen SL, y col., (1995) Efficient lipid-mediated transfection of DNA into primary rat hepatocytes. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* ;31(5):347–351.
- Hong S, Hwang DY, Yoon S, Isacson O, Ramezani A, Hawley RG, Kim KS (2007). Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Ther.* ;15(9):1630-9.
- Horan R, Powell R, Bird JM, Gannon F, Houghton JA (1992). Effects of electroporation on the association of foreign DNA with pig sperm. *Arch Androl*; 28:105-114.
- Houdebine LM. (2002). "Animal transgenesis: recent data and perspectives." *Biochimie* 84(11): 1137-41.
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, y col., (2002) Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and
- Ikawa, M., N. Tanaka, W. W. Kao and I. M. Verma (2003). "Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy." *Mol Ther* ;8(4): 666-73.
- Inoue T, Krumlauf R (2001). An impulse to the brain-using *in vivo* electroporation. *Nat Neurosci.* ;4:1156–1158.
- Ivics Z and Izsvak Z (2004). "Transposable elements for transgenesis and insertional mutagenesis in vertebrates: a contemporary review of experimental strategies." *Methods Mol Biol* ;260: 255-76.
- Jurica MS, and Stoddard BL(1999). Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* Volume 55, Issue 10, pp 1304-1326
- Kang JH, Hakimov H, Ruiz A, Friendship RM, Buhr M and Golovan SP (2008). The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology* ;70 1288–1296
- Keefer, C. L., H. Baldassarre, R. Keyston, B. Wang, B. Bhatia, A. S. Bilodeau, J. F. Zhou, M. Leduc, B. R. Downey, A. Lazaris, y col. (2001). "Generation of

- dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes." *Biol Reprod* 64(3): 849-56.
- Kervestin S, Jacobson A. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; Nov;13(11):700-12.
- Khorrarn, O., Shapiro, S., & Jones, J. (2000). Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 74:163–5.
- Kim HJ, y col., (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther.* ;7(11):1339–1346.
- Kim TK and Eberwine JH (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178.
- Kim TS, Lee SH, Gang GT, Lee YS, Kim SU, Koo DB, y col., (2009). Exogenous DNA Uptake of Boar Spermatozoa by a Magnetic Nanoparticle Vector System. *Reprod Domest Anim*
- Kishigami S, Wakayama T (2009). Somatic cell nuclear transfer in the mouse. *Methods Mol Biol.* ;518:207-218.
- Kitiyant Y, J Saikhun, J Guocheng, K Pavasuthipaisit. 2000. Establishment and long-term maintenance of bovine embryonic stemcell lines using mouse and bovine mixed feeder cells and their survival after cryopreservation. *Science Asia* 26, 81-86.
- Koo DB, Kang YK, Choi Han YM (2002). Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biology of Reproduction*, 67(2), 487–92.
- Kurome M, Ueda H, Tomii R, Naruse K, Nagashima H (2006). Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res* ;15(2):229-40.
- Kurome M, Saito H, Tomii R, Ueno S, Hiruma K, Nagashima H (2007). Effects of sperm pretreatment on efficiency of ICSI-mediated gene transfer in pigs. *J Reprod Dev.* ;53 (6):1217-26. Epub 2007 Oct 15.
- Lai L, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS (2002). Transgenic pig expressing the

- enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev*; 62: 300-306.
- Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Kühholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN, Prather RS (2001). Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes. *Zygote*. ;9(4):339-46.
- Lai, L., K. W. Park, H. T. Cheong, B. Kuhholzer, M. Samuel, A. Bonk, G. S. Im, A. Rieke, B. N. Day, C. N. Murphy, *et al.*, (2002). "Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells." *Mol Reprod Dev* 62(3): 300-6.
- Lanes CF, Sampaio LA and Marins LF (2009). Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Theriogenology* 71 525–533
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, M. D. West, E. Dorff, C. Tauer and R. M. Green (2001). "The ethical reasons for stem cell research." *Science* 292(5520): 1299.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*; 57(5): 717-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E (2003). Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev*. Mar;64(3):284-91
- Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moioli B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L(1997). Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc*. Dec ;29(8):3508-9
- Lazzari, G. (2002). Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. *Biology of Reproduction*, 67(3), 767–775.

- Li L, Shen W, Min L, Dong H, Sun Y and Pan Q (2006). Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* 18 689–695
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, and Boland MP (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals.* 38(4), 259–67.
- Luciano AM, Pocar P, Milanese E, Modena S, Rieger D, Lauria A, and Gandolfi F. (1999). Effect of Different Levels of Intracellular cAMP on the In Vitro Maturation of Cattle Oocytes and. *Mol Reprod Dev*, 91(February), 86–91.
- Malcuit C, Maserati M, Takahashi Y, Page R, Fissore RA (2006). Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal $[Ca^{2+}]_i$ responses and oocyte activation. *Reprod Fertil Dev.* ;18(1-2):39-51.
- Mao L, Lou H., Lou Y, Wang N, and Jin F. (2014). Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive Biomedicine Online*, 28(3), 284–299.
- McEvoy TG, Ashworth CJ, Rooke JA, Sinclair KD (2003). Consequences of manipulating gametes and embryos of ruminant species. *Reprod Suppl.*;61:167-82.
- Min, S H, Lee, E, Son, H H, Yeon, J Y, Koo, D B. (2013). Forced collapse of the blastocoel enhances survival of cryotop vitrified bovine hatching/hatched blastocysts derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Cryobiology*, 66(2), 195–9.
- Miragaya M , Revora M , Rigali F , Herrera C , Viviani L , Quintans C, Pascualini S and Lossino L (2009). “First equine clone born in argentina by somatic cell nuclear transfer from a polo argentino mare” *Reproduction, Fertility and Development* 23 (1) 131-131
- Mitalipova SM, KD Nusser, DP Wolf. (2001). Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol Reprod* 65, 253-259.
- Moreira PN, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Pozueta J, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A (2007). Effect of transgene concentration, flanking matrix attachment regions,

- and RecA-coating on the efficiency of mouse transgenesis mediated by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* ;76(2):336-43.
- Mori, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2002). Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 37(3), 181-4.
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, C. J. and Alberio R (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551-62.
- Murakami K, Fukamizu A (1999). Transgenic and knockout models in renin-angiotensin system. *Immunopharmacology*. 15;44(1-2):1-7. Review.
- Mutto A (2009). Clonación y Transgénesis en Animales de Interés Zootécnico por Transferencia Nuclear. *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de San Martín.
- Nagashima, H., T. Fujimura, Y. Takahagi, M. Kurome, N. Wako, T. Ochiai, R. Esaki, K. Kano, S. Saito, M. Okabe, y col., (2003). "Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs." *Theriogenology* 59(1): 95-106.
- Nakanishi A, Iritani A (1993). Gene transfer in the chicken by spermmediated methods. *Mol Reprod Dev* 36:258-61.
- Niemann H, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA and Carnwath JW. (2002). Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells* 4(1):29-38.
- Niemann, H. and W. A. Kues (2003). "Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine." *Anim Reprod Sci* 79(3-4): 291-317.
- Niu Y, Liang S (2008). Progress in gene transfer by germ cells in mammals. *Journal of Genetics and Genomics* 35: 701 - 714.
- O'Brien JA, Lummis SC (2006). Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nat Protoc.* ;1(2):977-981.

- Ogino H, McConnell WB, Grainger RM (2006). Highly efficient transgenesis in *Xenopus tropicalis* using I-SceI meganuclease. *Mech Dev*; 123: 103-113.
- Ortega NM and Bosch P (2012). "Methods of sperm selection for *in vitro* fertilization" (2012). *Book Chapter*. ISBN 979-953-307-566-1. <http://www.intechopen.com/books/in-vitro-fertilization-innovative-clinical-and-laboratory-aspects/methods-of-sperm-selection-for-in-vitro-fertilization>
- Ortega NM, Barrionuevo BE, Guido CB, Olmos MF, Fili A, Forcato DO, Bosch P (2011). "Enhancement of transfection efficiency of fetal bovine fibroblasts by manipulation of the cell cycle". *Biocell*, 35(1): A81, 60 ISSN 0327-9545.
- Ortega NM, Benítez SB, Barrionuevo BE, Olmos Nicotra MF, Alessio AP, Fili AE, Forcato DO, Stice SL, Bosch P (2012). "Meganuclease I-sceI enhances stable transgene integration in cultured bovine fetal fibroblasts". *Reproduction, Fertility and Development* 25(1) 170-171
- Oshimura M and Barrett JC (1997). "Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors." *European journal of cancer* 33(5): 710-715.
- Palma GA, Muller M and Brem G (1997). "Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*." *JReprod Fertil*, 110(2): 347-53.
- Palma GA, Tortonese DJ and Sinowatz F (2001). "Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes." *Anat Histol Embryol*. 30(5): 295-300.
- Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kuhholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol* 2001; 12: 173-181.
- Patil JG, Khoo HW (1996). Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J Exp Zool*; 274:121-9.
- Pereyra-Bonnet F, Bevacqua R, La Rosa I, Sipowicz P, Radrizzani M, Fernandez-Martin R, Salamone D (2011). Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, parthenogenic and IVF preimplantation bovine embryos. *Transgenic Res*.;20(6):1379-88

- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*; 284: 1180-1183.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* ;284:1180-1183.
- Perry DJ, Austin KJ, Hansen TR (1999). Cloning of interferon-stimulated gene 17: the promoter and nuclear proteins that regulate transcription. *Mol Endocrinol* ;13:1197–206.
- Pfeifer A, Verma IM (2001). Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* ;2:177–211.
- Plos One.*; 24;9(9):e108347.
- Polejaeva, I. A., S. H. Chen, T. D. Vaught, R. L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dai, J. Boone, S. Walker, D. L. Ayares, *et al.* (2000). "Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells." *Nature* 407(6800): 86-90.
- Primary transgenic bovine cells and their rejuvenated cloned equivalents show transgene-specific epigenetic differences. *Plos One.*;7(4):e35619.
- Rembold, M. y col., (2006) *Nature Protocols* 1, 1133–1139.
- Richard F J & Sirard M (1996). Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*, 54(1), 22–8.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–48.
- Roesler J, et al (2002). Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood.* ;100(13):4381–4390.

- Romero-Arredondo A and Seidel GE, J. (1994). Effects of bovine follicular fluid. *Theriogenology*, 383–394.
- Rose RD, Gilchrist RB, Kelly JM, Thompson JG, Sutton-McDowall ML (2013). Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, 79(1), 142–8.
- Rouet P, Smih F, Jasin M (1994). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91: 6064-6068.
- Saito S, K Sawai, H Ugai, S Moriyasu, A Minamihashi, Y Yamamoto, H Hirayama, S Kageyama, J Pan, T Murata, Y Kobayashi, Y Obata, KK Yokoyama. (2003). Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 104-113.
- Sanches BV, Marinho LSR, Filho BD, Pontes JH, Basso C, Meirinhos ML, Seneda MM (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, 80(4), 372–7.
- Sasseville M, Albuz FK, Côté N, Guillemette C, Gilchrist RB and Richard FJ (2009). Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, 81(2), 415–25.
- Sato F, Soh T, Hattori MA and Fujihara N 2003 Evaluation of deoxyribonuclease activity in seminal plasma of ejaculated chicken semen. *Asian J. Androl.* 5 213– 216
- Schenborn ET, Goiffon V (2000). DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Meth Mol Biol.*;130:147–153.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*; 278: 2130-2133.
- Scilingo AM, Ortega NM, Barrionuevo BE, Bringas M, Benitez SB, Guido CB, Olmos MF, Fili A, Forcato DO, Bosch P (2011). “Efficient transduction of bovine

- fetal fibroblasts by an adenoviral vector". *Biocell*, 35(1): A86, 80 ISSN 0327-9545.
- Shen W, Li L, Pan Q, Min L, Dong H, Deng J (2006). Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev*;73:589–94.
- Sirard MA (2011). Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(6), 483–8.
- Sirard MA, Coenen K (2006). In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol Biol.* ;348:35-42.
- Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, Jasin M (1995). Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*; 23: 5012-5019.
- Stice SL, NS Strelchenko, CL Keefer, L Matthews. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 54, 100-110.
- Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R, Moisyadi S. (2005) Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. *Biol Reprod.* ;73(6):1157-63.
- Sutton ML, Gilchrist RB and Thompson JG (2003). Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, 9(1), 35–48.
- Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* ; 118: 91-98.
- Thomas KR, Capecchi MR (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*; 51: 503-512.
- Thomas R E, Thompson JG, Armstrong DT & Gilchrist RB (2004). Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1142–9.

- Thomas RE, Armstrong, DT, & Gilchrist RB (2002). Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Developmental Biology*, 244(2), 215–25.
- Tsafiriri, Chun SY, Zhang R, Hsueh J & Conti M (1996). Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Developmental Biology*, 178(2), 393–402.
- Tsai HJ, Lai CH, Yang HS (1997). Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor suportexta*). *Transgenic Res*;6:85–95.
- Uhm SJ, Kim NH, Kim T, Chung HM, Chung KH, Lee HT, Chung KS. Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistant (Neo(R)) genes in porcine embryos following nuclear transfer with porcine fetal fibroblasts transfected by retrovirus vector. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 331-337.
- Ulloa SB, Heinzmann J, Herrmann D, Timmermann B, Baulain U, Grobfeld R, Niemann H (2014). Effects of different oocyte retrieval and in vitro maturation systems on bovine embryo development and quality. *Zygote (Cambridge, England)*, 1–11.
- Ushijima, H., Akiyama, K., & Tajima, T. (2008). Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *The Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 239–43.
- Vajta G, & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236–44.
- Van den Abbeel E, Balaban B., Ziebe, S., Lundin, K., Cuesta, M. J. G., Klein, B. M., Arce JC (2013). Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(4), 353–61.
- Van Soom, A, Boerjan, M L, Bols, P E, Vanroose, G, Lein, A, Coryn, M, & de Kruif, A. (1997). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos

- produced in vivo after superovulation. *Biology of Reproduction*, 57(5), 1041–1049
- Wall R J (1999). Sperm-mediated gene transfer: advances in sperm cell research and applications. *Transgenic Researches* 8: 313–315. Abstract.
- Wall RJ (1996). Transgenic Livestock: Progress and Prospects for the Future. *Theriogenology*; 45: 57-68.
- Wang L, E Duan, LY Sung, BS Jeong,XYang, XCTian. (2005). Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod* 73, 149-155.
- Wang Y, Zhou XY, Xiang PY, Wang LL, Tang H, Xie F, Li L, Wei H. (2014). The meganuclease I-SceI containing nuclear localization signal (NLS-I -SceI) efficiently mediated mammalian germline transgenesis via embryo cytoplasmic microinjection.
- Wang, B., H. Baldassarre, T. Tao, M. Gauthier, N. Neveu, J. F. Zhou, M. Leduc, F. Duguay, A. S. Bilodeau, A. Lazaris, *et al.*, (2002). "Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes." *Mol Reprod Dev* ;63(4): 437-43
- Wang, F, Tian, X, Zhou, Y, Tan, D, Zhu, S, Dai, Y, Liu, G. (2014). Melatonin Improves the Quality of In Vitro Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. *Plos One*, 9(4), e93641.
- Washbourne P, McAllister AK (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol.* ;12(5):566–573.
- Watson AJ (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, 85 (13): 1–3.
- Wells K, Moore K and Wall R(1999). "Transgene vectors go retro." *Nat Biotechnol* 17(1): 25-6.
- Wilmut I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell (1997). "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells." *Nature* 385(6619):810-3.

- Wolf E, Schernthaner W, Zakhartchenko V, Prella K, Stojkovic M and Brem G (2000). "Transgenic technology in farm animals--progress and perspectives." *Exp Physiol* ;85(6): 615-25.
- Wood Aj, Wen Lo Te, Zeitler B, y col., *Science* 2011; 333: 307.
- Woods NB, et al (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* ;101(4):1284–1289.
- Wrenzycki C, and Stinshoff H (2013). Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 48 (1): 38–43.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A Jr, Sirisathien S, Brackett B and Niemann H (2001). "Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos." *Hum Reprod* 16(5): 893-901.
- Wu GM, Nose K, Mori E, Mori T. (1990). Binding of foreign DNA to mouse sperm mediated by its MHC class II structure. *Am J Reprod Immunol.* 24(4):120-26
- Yamauchi Y, Doe B, Ajduk A, Ward MA (2007). Genomic DNA damage in mouse transgenesis. *Biol Reprod.* ;77(5):803-12.
- Yan Z, Sun X, and Engelhardt JF (2009) Progress and prospects: techniques for site-directed mutagenesis in animal models. *Gene Ther.* May;16(5):581-8
- Yanagimachi R (1994). Stability of the mammalian sperm nucleus. *Zygote.*;2(4):383-4.
Review
- Yao CP, y col.,(2008) Laser-based gene transfection and gene therapy. *IEEE Trans Nanobioscience* ;7(2):111–119.
- Yoon, H., Yoon, S., Son, W., Im, K., & Lim, J. (2001). High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertil. Steril.*, 75:832–3.
- Zhang F, Cong L, Lodato S, y col., *Nat. Biotechnol* 2011; 29, 149.