



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.
FACULTAD DE VETERINARIA

**TRANSGÉNESIS MEDIADA POR
ESPERMATOZOIDES EN LA ESPECIE
PORCINA (SMGT): FACTORES QUE
AFECTAN A LA EFICIENCIA DE LA
TÉCNICA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Francisco Alberto García Vázquez

Murcia, Diciembre 2007



UNIVERSIDAD
DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología
Fisiología Veterinaria

JOAQUÍN GADEA MATEOS, Profesor Titular del Departamento de Fisiología (Fisiología Veterinaria), de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia,

INFORMA:

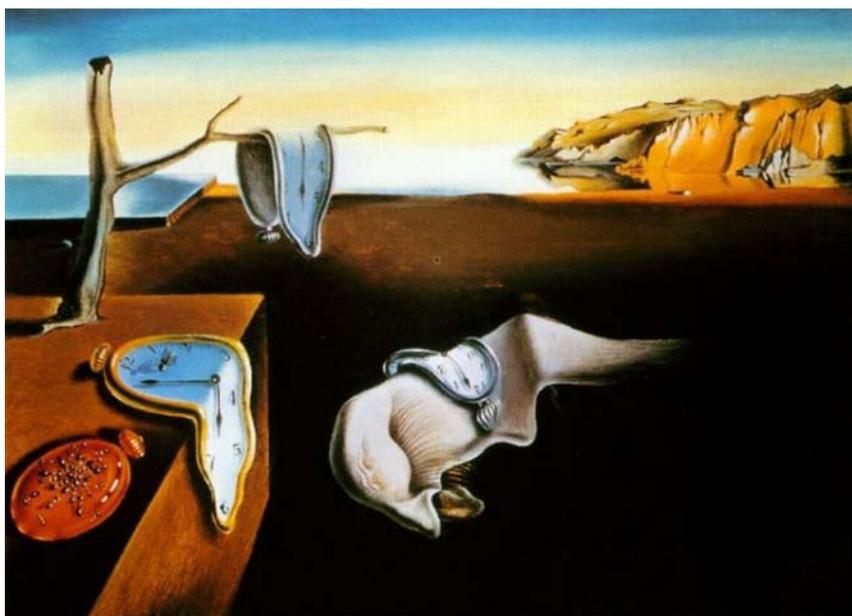
Que la Tesis Doctoral que lleva por título “TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES EN LA ESPECIE PORCINA: Factores que afectan a la eficiencia de la técnica” de la que es autor el Lcdo. en Veterinaria **D. Francisco Alberto García Vázquez**, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple todas las condiciones necesarias para su lectura.

Murcia a 12 de Octubre de 2007

Fdo.: Joaquín Gadea Mateos

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca a través de una Beca de Formación de Personal Investigador (Programa Seneca 2002).

Financiado parcialmente por los proyectos BIOCARM 10BIO2005/01-6463, AGL2006-03495/GAN y Fundación Séneca 03018/PI/GAN



"La persistencia de la memoria"-Salvador Dalí 1931

"A veces, ante la mala manera de ser de los otros, uno se siente orgulloso de ser uno mismo y no otro"

Anónimo

A papá, mamá

A Carmen y Mary

A los melli

A Paqui

A mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

Uno sabe cuándo empieza la Tesis pero no cuando la termina..., pues bien parece que ha llegado mi momento. Después de más de 4 años en el Departamento mucha es la gente que ha trabajado en el laboratorio, que ha pasado por ese largo pasillo..., por lo que muchas son las personas a las que tengo que agradecer que el sueño de ser Doctor se haga realidad. Pero esto solo es un paso más en la vida, lo más importante y lo que realmente perdura es la amistad, sin duda la gente que he conocido, y los grandes amigos que creo voy a tener para siempre, no hace falta que diga los nombres ellos ya saben quiénes son, nada más que por ellos tanto esfuerzo, no solo por hacer esta Tesis sino por su apoyo en los malos momentos (que no han sido pocos...), qué duda cabe, habrá merecido la pena, ...porque la amistad es la cosa más difícil en el mundo de explicar, no es algo que aprendes en el colegio, pero si no has aprendido el significado de la amistad, en realidad no has aprendido nada. En estas pocas palabras que voy a escribir no queda reflejado en muchos casos todo lo que realmente quisiera decir, en unos casos porque no me fluyen las palabras, y en otros... A todos ellos van dedicadas estas líneas.

A Papá y Mamá, por darme la vida...Al Pá por la educación recibida, no solo a mí sino a todos mis herman@s, por llevar una familia tan numerosa adelante.

A todos mis herman@s, Carmen, Mary, Guille y Almu...por toda una vida llena de alegrías que nos queda por pasar juntos.

A Carlos, que ha pasado a formar parte oficialmente de la familia.

A mi director de Tesis, Joaquín Gadea Mateos, por haberme dado la oportunidad de investigar en el mundo de la Reproducción y la Transgénesis, por su disponibilidad en todo momento a lo largo de estos años, y sobre todo por hacer realidad mi Tesis Doctoral.

Carmela, en estas pocas palabras no puedo expresar todo el apoyo que has significado para mí estos años, todos esos cafés y comidas juntos, las quinielas (algún día nos tocara y nos retiraremos), todas las horas bajo el sol de las regatas, por hacerme sentir casi como un hijo, y un sinfín de historias...han hecho que me dé cuenta que todas las mañanas desayunaba con una de las mejores personas que conozco, que he conocido y que conoceré, gracias por tu más sincero apoyo en todo momento, por tus consejos personales y profesionales, pero sobre todo por tu amistad, que espero que dure toda la vida, por todo...gracias.

A Salva, gracias por todo, por tu esfuerzo en poner la "minigranja" y el quirófano a punto, por todas las cirugías que hemos compartido (y las que nos quedan), por tu ayuda en las ecografías, inseminaciones...por tu más sincera colaboración y disposición en todo momento...gracias.

A las profesoras Pilar Coy y Raquel Romar, mi más sincero agradecimiento por todo cuanto me enseñaron en mis inicios en el laboratorio y tantas otras cosas que descubrí gracias a ellas.

A Alfonso Gutiérrez-Adán, por su colaboración y disponibilidad inestimable, por su ayuda más sincera en todo momento para la realización de esta Tesis.

A Iván y Mariajo, que os puedo decir que no sepáis. Daros las gracias es poco en comparación de lo que me habéis aportado en tantos años de amistad (ya he perdido la cuenta). Gracias por estar siempre cerca de mí, por escucharme, por tantos momentos vividos juntos (espero que nos queden aún muchos por disfrutar), por vuestro apoyo incondicional...por todo GRACIAS.

Ahora os toca a vosotros, si a mis becarios favoritos, Empar, David y Manolo, jamás olvidaré la gran amistad y la pequeña familia que formamos los "cuatro", estoy escribiendo estas palabras y me embarga la emoción, se me agolpan en mi cabeza cientos de recuerdos, y...todos ellos buenos. Mi Deivid y mi Manolico, uff... qué tiempos aquellos cuando salíamos los jueves rompiendo moldes, esas resacas en el departamento los viernes, nuestro viaje a Granada, todas las historias que podríamos contar... Sé que nuestra amistad no tiene fecha de caducidad.

Al Sanse, ese lorquino...digo aguileño de pura cepa, por hacer cambiar con tu buen humor los peores días de trabajo, por hacer sonreír a todo el mundo que te rodea...por ser simplemente como eres...y como dijo Parménides "Lo que es es y lo que no es no es"...no cambies nunca.

A David por su gran ayuda prestada en todo momento para la realización de esta Tesis, por las horas eternas en el citómetro de "fluzo", en el microscopio electrónico,...nuestras aventuras en Granada, Galicia, EE.UU..., porque gente como tu se echa de menos en un laboratorio...te mereces lo mejor.

A Empar, sabes que tengo mucho que agradecerte, por ser tan buena profesora (aunque nunca hare la ICSI tan bien como tu), por todos los momentos que hemos vivido juntos, nuestros congresos en Polonia, Eslovenia... (y alguno más que nos quedará) porque nunca habrá una becaria como tú en el Departamento (lo siento por las demás, pero es que es mi Emparica). Gracias.

A mis niñas Olga, Esther, Juani, María, Sara y Ángela. Gracias por hacerme tan ameno mis primeros meses de becario, esos escándalos en el laboratorio...que nos dieron algún problemilla que otro!!!Gracias a todas por hacer mi vida en la facultad más fácil, por vuestras visitas, por los cumpleaños, novatadas, fiestas, cenas,...gracias por escucharme en todo momento, por estos años de gran amistad, gracias por hacerme sentir ser la envidia de toda la facultad por tener las amigas más guapas,...por todos los momentos compartidos. Gracias por todo, sin vosotras esta Tesis no hubiera sido lo mismo. Gracias de todo corazón.

A Luisito (...bueno mejor Luis, que ya es todo un hombre), gracias por todas las aventuras vividas (...y las que nos quedan), por aportar toda tu ayuda en las cirugías, inseminaciones, ecografías, por tu máxima colaboración en la impresión de la Tesis, por todas las horas de despacho compartidas...por tu amistad más sincera.

A Aitor, ese niño metido en un cuerpo de hombre, por tu alegría y energía contagiosa, por tus grandes consejos, por tu saber estar pero sobre todo...y en mi más humilde opinión... gracias por tu amistad.

A Ángeles, por alegrar con tus visitas el Departamento, por tu paciencia casi infinita, por escucharme (mejor por aguantarme...) y por estar siempre cerca..., te mereces todo lo mejor, porque eres una persona maravillosa (a pesar de todas las discusiones que hemos tenido ehh!!!).

A Karen,...ay mi Karen!!...para que después digas que no me acuerdo de ti. Gracias por tu amistad y por todos los momentos compartidos (espero que me sigas haciendo esas comidas mexicanas tan ricas!!!).

A Juan Carlos Gardón, (Juanchi para los amigos), gracias por todos los consejos que me has dado durante estos años, y por supuesto por esos asados argentinos que haces como nadie!!! Gracias amigo.

A Lolis, agradecerte el apoyo y colaboración en la realización de esta Tesis (aunque casi me dejaras sin anticuerpo, jeje!!), ese pedazo viaje a Japón que nos hemos llevado, y sobre todo tu amistad.

A Luis Cesar,...ya hemos visto la luz del túnel!!!!...parecía que no llegaría nunca, espero que te vaya genial en tu vuelta a Colombia, y que sigas conservando la familia tan maravillosa que tienes.

A Manolo Avilés, por su colaboración y consejos a lo largo de estos años.

A mis amigos colombianos José Guillermo y Patricia, aunque hace ya dos años que os fuisteis todavía me acuerdo de vosotros. Mi Patri, mi compañera de despacho. Gracias a los dos por estar ahí en los comienzos de esta Tesis.

A los técnicos de laboratorio, Juan Yecla, Juan Cartagena y Soledad, por todas las muestras recogidas, los medios preparados, por aguantar nuestras exigencias...gracias.

Gracias Juanico CT por tus correos culturales y por tu amistad.

A Carlitos, por toda su colaboración en las necropsias y tratamientos de las muestras de tejidos, y como no...en solucionar todos los problemas informáticos una y otra vez.

A la Fundación Séneca por la financiación económica prestada a través de la beca FPI concedida para la realización de la Tesis.

A todas las hembras de "El Pozo" y los machos de "Lo Navarro", y a las cerditas de nuestra granja "pinypon", por aportar desinteresadamente su material biológico, sin ellos realmente no llegaríamos a ningún lado, por eso GRACIAS.

A mi cerdita "Benita", por portarte tan bien y quedarte preñá, gracias por darle ese toque de calidad a mi Tesis (...venga y también la tuya...).

Gracias a la granja "Lo Navarro", y en especial a Piedi por todo el follón que te he dado a lo largo de estos años, que si 10, no 15, no 20 ml, los martes, miércoles y fiestas de guardar..., por tu paciencia, gracias.

Al matadero "El Pozo" por permitirnos recoger la base de nuestros experimentos, gracias.

A mi "primico" David, por todos los veranos vividos, por tus consejos, por estar siempre ahí..., por esos recursos compartidos, por ser tan buena persona. Muchas gracias primo.

Gracias a todos mis amig@s...de la playa, de las regatas, de la Universidad, los españoles más mexicanos, los del Master,...

Gracias a todos aquellos que me han acogido en sus laboratorios a lo largo de todos estos años (en Italia, EE.UU, México, Hungría, Japón), en especial al profesor Ducci y Hiro, y a la profesora Lavitrano, por hacerme sentir como en casa.

Gracias a todos aquell@s personas que de un modo u otro, para bien o para mal, han contribuido a la realización de esta Tesis... "es de bien nacidos ser agradecidos"...

"La ciencia es larga y la vida breve"
Lucio Anneo Séneca. Filósofo (4 a.c-65 d.c)

ÍNDICE/INDEX

RESUMEN

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN Y DEFINICIÓN DE ANIMAL TRANSGÉNICO	3
1.2 ANIMALES TRANSGÉNICOS: APLICACIONES	5
1.2.1 Estudio de la función de los genes y de las enfermedades humanas	5
1.2.2 Órganos y tejidos de cerdo para trasplantes a humanos.....	7
1.2.3 Animales transgénicos como productores de proteínas y otras biomoléculas de uso terapéutico.....	11
1.2.4 Mejora de la producción animal	13
1.3 TRANSGÉNESIS: PERSPECTIVAS Y FUTURO.....	16
1.4 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS	17
1.4.1 Microinyección pronuclear.....	17
1.4.2 Transferencia de ADN usando vectores virales	19
1.4.3 Células embrionarias indiferenciadas y germinales	21
1.4.4 Lipofección	22
1.4.5 Electroporación	23
1.4.6 Biolística	23
1.4.7 Transferencia nuclear.....	24
1.4.8 Transgénesis mediada por espermatozoides	25
1.5 TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES (SMGT).....	27
1.5.1 Introducción. Breve historia de la SMGT	27
1.5.2 Interacción espermatozoide-ADN exógeno	30

1.5.2.1 Aspectos técnicos de la SMGT	30
1.5.2.2 Mecanismo molecular de interacción ADN-espermatozoide	37
1.5.2.3 Organización e integración del ADN exógeno interiorizado en el núcleo espermático.....	40
1.5.3 Localización del ADN exógeno en el espermatozoide. Métodos de evaluación.....	43
1.5.4 Producción de “espermatozoides transgénicos” en diferentes especies.....	52
1.5.5 Producción de animales transgénicos en diferentes especies mediante SMGT.....	54
1.5.5.1 Obtención de embriones transgénicos por FIV e ICSI mediante SMGT	54
1.5.5.1.1 “Transgénesis activa”: Uso de la recombinasa RecA.....	63
1.5.5.2 Uso de la inseminación artificial (IA) como método para la obtención de animales transgénicos por SMGT	67
1.5.5.2.1 Inseminaciones convencionales.....	67
1.5.5.2.2 Inseminaciones quirúrgicas	69
1.5.5.3 Obtención de animales transgénicos por SMGT mediante transferencia de embriones.....	71
1.6 VENTAJAS EN EL USO DE SMGT	75
1.7 CONTROVERSIAS CON LA TÉCNICA DE SMGT	76
1.8 RECIENTES AVANCES EN SMGT	78
1.9 ESTRUCTURA DE UN TRANSGÉN. PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE: GFP	81
1.9.1 Historia de la GFP.....	82
1.9.2 Estructura y características de GFP	83
1.9.3 Aplicaciones de la GFP	83
1.9.4 Detección de la GFP.....	86
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	89

3. MATERIAL Y MÉTODOS	97
3.1 VALORACIÓN ESPERMÁTICA	97
3.1.1 Animales.....	97
3.1.2 Medio utilizado para el procesado espermático.....	98
3.1.3 Construcción y marcado del ADN	98
3.1.4 Recogida del semen.....	101
3.1.4.1 Recogida de espermatozoides eyaculados	101
3.1.4.2 Recogida de espermatozoides de epidídimo.....	101
3.1.5 Valoración de la funcionalidad espermática	101
3.1.5.1 Evaluación inicial de la calidad seminal	101
3.1.5.2 Evaluación de la integridad de membrana	102
3.1.5.3 Evaluación del desorden lipídico en la membrana plasmática	103
3.1.6 Procesado de espermatozoides e incubación con ADN	104
3.1.6.1 Procesado de espermatozoides eyaculados.....	104
3.1.6.2 Procesado de espermatozoides procedentes de epidídimo.....	106
3.1.7 Tratamientos espermáticos.....	106
3.1.8 Evaluación de la interacción entre ADN y espermatozoides.....	108
3.1.8.1 Evaluación de la unión espermatozoide–ADN mediante microscopía de fluorescencia.....	108
3.1.8.2 Evaluación de la unión espermatozoide–ADN mediante citometría de flujo	110
3.1.8.2.1 Estudio de la cinética de unión entre las células espermáticas y el ADN exógeno	110
3.1.8.2.2 Evaluación de la unión entre ADN y espermatozoides, y la viabilidad espermática.....	111
3.1.8.3 Determinación del lugar de interacción entre el transgén y el espermatozoide	112
3.1.8.3.1 Ensayo Ab-peroxidasa (Ab-HRP)	113
3.1.8.3.2 Ensayo Ab-fluoresceína (Ab-FITC)	114

3.1.8.3.3 Ensayo con oro coloidal	115
3.2 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS.....	121
3.2.1 Animales y material biológico.....	121
3.2.2 Medios de lavado y manipulación gametos.....	121
3.2.3 Medios de cultivo y suplementos.....	122
3.2.4 Maduración <i>in vitro</i> (MIV) de ovocitos	125
3.2.5 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	127
3.2.6 Preparación de espermatozoides para ICSI	128
3.2.7 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	128
3.2.8 Preparación de espermatozoides para FIV.....	128
3.2.9 Cultivo de embriones	130
3.2.10 Valoración microscópica de los resultados	130
3.2.10.1 Valoración del desarrollo embrionario	130
3.2.10.2 Valoración de los embriones transgénicos	131
3.3 INSEMINACIONES Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	135
3.3.1 Animales.....	135
3.3.2 Inducción y detección del celo	135
3.3.3 Diagnóstico por ecografía de la ovulación y de la gestación	136
3.3.4 Inseminación intrauterina profunda.....	136
3.3.4.1 Preparación del semen	136
3.3.4.2 Cateterización intrauterina profunda	137
3.3.5 Intervenciones quirúrgicas para inseminación intrauterina, transferencia y recogida de embriones.....	141
3.3.5.1 Anestesia y analgesia.....	141
3.3.5.2 Apertura y cierre de la cavidad abdominal.....	141
3.3.5.3 Inseminación intrauterina quirúrgica	142
3.3.5.3.1 Preparación y transporte de los espermatozoides	142
3.3.5.3.2 Inseminación intrauterina	143
3.3.5.3.3 Recogida de embriones.....	143
3.3.5.4 Transferencia de embriones.....	143

3.3.5.4.1 Preparación y transporte de los cigotos	143
3.3.5.4.2 Transferencia de embriones.....	144
3.3.6 Manejo de gestación, parto y lechones	151
3.3.7 Obtención de muestras y biopsias en los lechones vivos.....	151
3.3.7.1 Laparotomía	151
3.3.7.2 Pinzas de biopsia endoscópica	152
3.3.7.3 Agujas de biopsia	153
3.3.7.4 Otras muestras	153
3.3.8 Evaluación de la integración del ADN y expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP).....	153
3.3.8.1 Integración de la EGFP.....	153
3.3.8.2 Expresión de la EGFP	155
3.3.9 Sacrificio de los animales.....	160
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	161
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	174
4. RESULTADOS	177
4.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE ADN EXÓGENO A LOS ESPERMATOZOIDES PORCINOS.....	177
4.1.1 Efecto de la presencia o ausencia del plasma seminal en la unión espermatozoide-ADN exógeno	177
4.1.1.1 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno mediante el uso de espermatozoides eyaculados	177
4.1.1.2 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides de origen epididimario.....	181
4.1.2 Evaluación de la cinética de unión entre los espermatozoides y el transgén.....	182
4.1.3 Efecto del medio de incubación de los espermatozoides con el ADN exógeno: TALP vs. SFM vs. SFM-PS	184

4.1.4 Efecto del tratamiento espermático en la interacción ADN exógeno-espermatozoide	187
4.1.4.1 Uso de espermatozoides congelados	187
4.1.4.2 Uso de espermatozoides tratados con Tritón X-100	189
4.1.4.3 Uso de espermatozoides tratados con DMSO	190
4.1.4.4 Uso de espermatozoides incubados con complejos RecA:ADN	191
4.1.5 Efecto del tamaño del transgén sobre la unión con el espermatozoide	193
4.1.6 Localización de la interacción entre el transgén y el espermatozoide	195
4.2 VALORACIÓN DE LA PRODUCCION <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS.....	199
4.2.1 Evaluación de la técnica transgénesis espermática mediante ICSI sobre el desarrollo de embriones transgénicos.....	199
4.2.1.1 Eficiencia de la técnica de transgénesis espermática mediante ICSI utilizando espermatozoides intactos	199
4.2.1.2 Efecto de la permeabilización de membranas por métodos físicos: Congelación-descongelación y congelación rápida, sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI.....	200
4.2.1.3 Efecto de la permeabilización de membranas por métodos químicos (Tritón X-100) sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI	202
4.2.1.4 Efecto del uso de la recombinasa RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI	202
4.2.2 Evaluación de la técnica transgénesis espermática mediante FIV utilizando semen intacto. Efecto del uso de la recombinasa RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por FIV.....	204
4.3 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN <i>IN VIVO</i> DE EMBRIONES Y LECHONES TRANSGÉNICOS	205
4.3.1 Obtención de lechones transgénicos por inseminación intrauterina profunda.....	205
4.3.2 Obtención de embriones transgénicos por inseminación intrauterina quirúrgica	206

4.3.3 Obtención de lechones transgénicos por transferencia quirúrgica de embriones.....	207
4.3.3.1 Análisis de la integración del transgén.....	210
4.3.3.2 Análisis de la expresión de la proteína EGFP.....	212
5. DISCUSIÓN.....	219
6. INVESTIGACIÓN FUTURA	263
7. CONCLUSIONES	267
8. ABREVIATURAS	271
9. BIBLIOGRAFÍA	277

ENGLISH SECTION

SUMMARY

3. MATERIAL AND METHODS.....	315
3.1 SPERM EVALUATION	315
3.1.1 Animals	315
3.1.2 Medium used for spermatic processing	315
3.1.3 DNA construction and labelling	316
3.1.4 Semen recovery	317
3.1.4.1 Ejaculated spermatozoa recovery	317
3.1.4.2 Epididymal spermatozoa recovery.....	317
3.1.5 Evaluation of spermatic functionality	317
3.1.5.1 Routine laboratory evaluation of semen	317
3.1.5.2 Evaluation of membrane integrity	318
3.1.5.3 Evaluation of lipid disorder in plasma membrane	318

3.1.6	Spermatozoa processing and incubation with DNA.....	319
3.1.6.1	Processing of ejaculated spermatozoa	319
3.1.6.2	Processing of epididymal spermatozoa	319
3.1.7	Sperm treatments	319
3.1.8	Evaluation of the interaction between DNA and spermatozoa	321
3.1.8.1	Evaluation of spermatozoa-DNA binding by fluorescence microscopy	321
3.1.8.2	Evaluation of spermatozoa-DNA binding by flow cytometry	322
3.1.8.2.1	Study of binding kinetics between sperm cells and exogenous DNA.....	322
3.1.8.2.2	Evaluation of the DNA binding capacity and sperm viability	322
3.1.8.3	Determination of the interaction place between transgene and spermatozoa	322
3.1.8.3.1	Ab-Horseradish peroxidase test (HRP)	323
3.1.8.3.2	Ab-fluorescein test (Ab-FITC)	324
3.1.8.3.3	Colloidal gold assay.....	325

3.2 EVALUATION OF *IN VITRO* PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS 326

3.2.1	Animals and biological material	326
3.2.2	Washing and gamete manipulation media	326
3.2.3	Culture media and supplements	327
3.2.4	<i>In vitro</i> maturation (IVM) of oocytes	329
3.2.5	Intracytoplasmic sperm injection (ICSI).....	330
3.2.6	Preparation of spermatozoa for ICSI	331
3.2.7	<i>In vitro</i> fertilization (IVF).....	331
3.2.8	Preparation of spermatozoa for <i>in vitro</i> fertilization	331
3.2.9	Embryo culture	332
3.2.10	Microscopic evaluation of the embryos.....	332
3.2.10.1	Assessment of embryo development	332
3.2.10.2	Evaluation of transgenic embryos	333

3.3 INSEMINATION AND EMBRYO TRANSFER.....	333
3.3.1 Animals	333
3.3.2 Oestrus induction and detection	333
3.3.3 Ovulation and pregnancy diagnosis by ultrasonography	334
3.3.4 Deep intrauterine insemination.....	334
3.3.4.1 Semen preparation.....	334
3.3.4.2 Deep intrauterine catheterization.....	334
3.3.5 Surgical interventions for intrauterine insemination, embryo transfer and collection	334
3.3.5.1 Anesthesia and analgesia	334
3.3.5.2 Surgical intrauterine insemination.....	335
3.3.5.2.1 Spermatozoa preparation and transport of seminal samples.....	335
3.3.5.2.2 Intrauterine insemination.....	335
3.3.5.2.3 Embryo collection	336
3.3.5.3 Embryo transfer	336
3.3.5.3.1 Zygote preparation and transport.....	336
3.3.5.3.2 Embryo transfer	336
3.3.6 Gestation, labour and piglet handling	336
3.3.7 Biopsy and tissue sampling in the piglets	337
3.3.7.1 Laparotomy.....	337
3.3.7.2 Endoscopic biopsy needle	337
3.3.7.3 Biopsy needle	337
3.3.7.4 Other samples	338
3.3.8 Evaluation of integration of DNA and expression of green fluorescent protein (EGFP).....	338
3.3.8.1 DNA integration	338
3.3.8.2 EGFP expression	338
3.3.9 Euthanasia of animals	342
3.4 EXPERIMENTAL DESIGN	343

3.5 STATISTICAL ANALYSIS.....	347
4. RESULTS.....	351
4.1 EVALUATION OF THE PIG SPERMATOZOA–EXOGENOUS DNA BINDING CAPACITY.....	351
4.1.1 Effect of the presence or absence of the seminal plasma in the spermatozoa-exogenous DNA binding capacity	351
4.1.1.1 Evaluation of DNA binding capacity in ejaculated spermatozoa	351
4.1.1.2 Evaluation of DNA binding capacity in epididymal spermatozoa	355
4.1.2 Evaluation of kinetic of binding between the spermatozoa and DNA.....	355
4.1.3 Effect of culture medium on the spermatozoa binding to the exogenous DNA: TALP vs. SFM vs. SFM-PS	358
4.1.4 Effect of the sperm treatment in the interaction DNA- spermatozoa	360
4.1.4.1 Use of frozen-thawed spermatozoa	360
4.1.4.2 Use of spermatozoa treated by Triton X-100	362
4.1.4.3 Use of spermatozoa treated by DMSO	363
4.1.4.4 Use of spermatozoa incubated with RecA:DNA complexes.....	364
4.1.5 Effect of the DNA size on the capacity of binding to spermatozoa	366
4.1.6 Location of the interaction between DNA and spermatozoa	368
4.2 EVALUATION OF <i>IN VITRO</i> PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS	372
4.2.1 Evaluation of <i>in vitro</i> production of transgenic embryos by ICSI.....	372
4.2.1.1 Evaluation of <i>in vitro</i> production of transgenic embryos by ICSI using fresh spermatozoa	372
4.2.1.2 Evaluation of <i>in vitro</i> production of transgenic embryos by ICSI using frozen-thawed and quick frozen spermatozoa	373

4.2.1.3 Evaluation of <i>in vitro</i> production of transgenic embryos by ICSI using spermatozoa treated by Triton X-100	374
4.2.1.4 Evaluation of <i>in vitro</i> production of transgenic embryos by ICSI using spermatozoa treated by RecA recombinase	375
4.2.2 Evaluation of <i>in vitro</i> production of transgenic embryos by IVF using fresh and treated spermatozoa by RecA recombinase.....	376
4.3 EVALUATION OF <i>IN VIVO</i> PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS AND PIGLETS	377
4.3.1 Evaluation of <i>in vivo</i> production of transgenic piglets by deep intrauterine artificial insemination	377
4.3.2 Evaluation of <i>in vivo</i> production of transgenic embryos by deep laparotomy intrauterine artificial insemination	378
4.3.3 Evaluation of transgenic piglets production by embryo transfer	379
5. DISCUSSION.....	391
6. FURTHER RESEARCHES	409
7. CONCLUSIONS	413

RESUMEN

La transgénesis es una potente herramienta biotecnológica para la generación de animales modificados genéticamente con aplicaciones en diversas áreas como veterinaria, biomedicina y agricultura. En 1989, el grupo de investigación dirigido por la Dra. *Marialuisa Lavitrano* describe un nuevo método para la producción de animales transgénicos, la **transgénesis mediada por espermatozoides** (SMGT). Este método está basado en la habilidad intrínseca de las células espermáticas para unir e interiorizar ADN exógeno y permitir su transferencia al interior de los ovocitos tras la fecundación, e integrarse en el genoma del nuevo embrión. El objetivo global de este estudio fue desarrollar un método eficiente de producción *in vitro* de embriones porcinos y lechones transgénicos aprovechando la capacidad de transferencia de ADN exógeno que presenta el espermatozoide. Para ello, se analizaron diferentes factores agrupados en 3 experiencias: 1) La capacidad de transferencia de ADN exógeno de los espermatozoides porcinos; 2) El efecto de diferentes tratamientos espermáticos sobre la producción *in vitro* y el desarrollo de embriones transgénicos; y por último, 3) La valoración de la producción *in vivo* de embriones y lechones transgénicos.

Para conseguir los **objetivos** propuestos, en primer lugar, se valoró la interacción entre el transgén y los espermatozoides estudiando el porcentaje de unión en los diferentes tratamientos espermáticos, medios de incubación, cinética de unión entre los espermatozoides y el ADN, y la localización de esta interacción. En segundo lugar, evaluamos la capacidad de producción de embriones transgénicos mediante esta técnica, utilizando para ello la fecundación *in vitro* (FIV e ICSI) con diversos tratamientos espermáticos. En tercer lugar, pretendimos aplicar los resultados obtenidos en el laboratorio a la producción de embriones y lechones transgénicos mediante el uso de diferentes técnicas biotecnológicas reproductivas (transferencia de embriones, inseminaciones intrauterinas profundas quirúrgicas y no quirúrgicas).

En el **primer bloque de experiencias**, los resultados del estudio indicaron que la presencia del plasma seminal inhibió la interacción de los espermatozoides con el ADN. Los tratamientos de permeabilización de las membranas espermáticas aumentan el porcentaje de unión al ADN, y esta interacción ADN-espermatozoide se produce, en mayor medida, durante los primeros 15 minutos de incubación. Además, la unión al ADN está asociada a la desestabilización de la membrana espermática y por tanto es necesario optimizar los sistemas de preparación de espermatozoides para poder conseguir el mayor número de espermatozoides vivos capaces de transportar ADN. En relación a la localización del plásmido en los espermatozoides, observamos que el ADN se une a la región postacrosomal, al acrosoma y a la matriz acrosomal, además de la región ecuatorial en las proximidades del núcleo espermático.

En el **segundo bloque de experiencias**, los resultados indican que, bajo las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, la utilización de la fecundación *in vitro* (FIV-SMGT porcina) no permitió obtener ningún embrión transgénico, sin que, hasta el momento, conozcamos que ningún otro grupo lo haya conseguido. Sin embargo, el empleo de la ICSI ha permitido la obtención de altos porcentajes de embriones que expresaban la proteína EGFP. Los tratamientos espermáticos tienen efecto sobre el rendimiento de la técnica de ICSI, obteniéndose los mejores resultados cuando los espermatozoides fueron coincubados con la proteína RecA, con aproximadamente el 90% de los embriones producidos que expresaban la proteína EGFP.

Por último, en relación al desarrollo *in vivo*, no obtuvimos ningún embrión ni lechón modificado genéticamente mediante inseminaciones intrauterinas tanto quirúrgica como no quirúrgica. Respecto a las transferencias de embriones producidos por ICSI, obtuvimos una gestación que dio lugar a 8 lechones (los primeros lechones nacidos en España mediante ICSI), de los cuales 2 fueron transgénicos, siendo los primeros lechones transgénicos nacidos en Europa mediante la técnica SMGT-ICSI y los primeros del mundo mediante la combinación de SMGT-ICSI y una recombinasa.

En **conclusión**, la combinación de la técnica de ICSI y SMGT es un método eficiente para la producción de lechones y embriones transgénicos, viéndose incrementada su eficiencia mediante el uso de la recombinasa RecA.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUCCIÓN Y DEFINICIÓN DE ANIMAL TRANSGÉNICO

Durante décadas los ganaderos han seleccionado los genes más adecuados mediante cruzamientos entre animales de la misma especie, buscando los alelos más favorables según el requerimiento del mercado tales como la mayor producción, menor engrasamiento, etc. Pero este proceso requiere de un largo periodo de tiempo hasta conseguir el producto o animal deseado. Por ello, la transgénesis ha sido uno de los más recientes e importantes avances en la biotecnología animal, existiendo aplicaciones en diversas áreas de la investigación biológica y biomédica, como son la genética (genes implicados en el cáncer, regulación del sistema inmunológico, control del crecimiento), la agricultura (mejora de la producción, resistencia a enfermedades), y la producción de órganos modificados genéticamente para xenotrasplantes (producción de órganos animales con genes humanos).

Un **animal transgénico** es aquel en el que se ha modificado la información genética de forma intencionada por el hombre, mediante la introducción de nueva información o por la supresión dirigida de información existente (Wall 1996). Podemos definir, por tanto, **transgén** como la unidad de formación genética que se introduce en el individuo transgénico.

La transgénesis nos ofrece una gran variedad de nuevas posibilidades. El hecho más importante es la transferencia estable en el genoma de una información conocida procedente o no de la misma especie. Este método es por tanto, más preciso y genera una mayor diversidad que la selección natural. La transgénesis ha comenzado a ser una herramienta esencial en el estudio de la función genómica. Ello ha dado la posibilidad a los investigadores de estudiar los genes en su ambiente natural.

Los primeros animales transgénicos fueron producidos por *Gordon & Ruddle* en 1981 mediante microinyección pronuclear. Estos autores crearon ratones gigantes mediante la introducción del transgén que codificaba la hormona del crecimiento humano en embriones de una sola célula. A mediados de los años 80 y durante la década de los 90 se aplicó esta tecnología para obtener animales de granja transgénicos como son conejos, ovejas y cerdos (*Hammer et al.* 1985), vacas y cabras (*Pursel & Rexroad* 1993a). En todos estos estudios con animales de granja se hizo evidente que la eficiencia en la generación de animales transgénicos era menor que la obtenida previamente en ratones.

Desde que se crearan los primeros animales transgénicos de granja hace 25 años (*Hammer et al.* 1985), una gran variedad de métodos se han ido desarrollando para la producción de animales transgénicos (*Wall* 2001, 2002). Entre las que destacamos: la microinyección pronuclear, el empleo de virus, células embrionarias indiferenciadas, transferencia nuclear, espermatozoides como vectores, biolística, electroporación y liposomas, que desarrollaremos con mayor profundidad en el capítulo correspondiente.

En la actualidad existen principalmente 3 métodos para la producción de animales transgénicos de granja: (1) Microinyección directa de ADN exógeno en el pronúcleo de ovocitos fecundados; (2) Transferencia nuclear usando embriones modificados genéticamente o donador de células somáticas; y (3) Vectores virales para la introducción de ADN exógeno en los embriones (*Kues & Niemann* 2004). Los problemas o limitaciones de estos métodos derivan de su baja eficiencia, inversiones elevadas y por último, la dificultad que supone el manejo de los embriones en estadios tempranos de su desarrollo. Además el uso de retrovirus como vectores puede conllevar riesgos sanitarios a considerar.

1.2 ANIMALES TRANSGÉNICOS: APLICACIONES

La transgénesis es una potente herramienta biotecnológica para la generación de animales modificados genéticamente con aplicaciones en diversas áreas como veterinaria, biomedicina y agricultura. Los animales transgénicos se pueden utilizar para varios propósitos. *Wheeler* en 2003, propone algunas aplicaciones para la producción de animales transgénicos:

- 1) Adquirir nuevos conocimientos
- 2) Descifrar el código genético
- 3) Estudio genético de los sistemas fisiológicos
- 4) Construir modelos genéticos de enfermedades
- 5) Mejorar la producción animal
- 6) Producir nuevos productos animales

Estas aplicaciones las podemos dividir en varias categorías: (i) obtención de información de la regulación y función de los genes que controlan las enfermedades humanas, (ii) obtención de productos de alto valor (proteínas farmacológicas recombinantes, órganos para xenotrasplantes, etc.) para su uso en terapias humanas, (iii) mejora de la producción animal.

1.2.1 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS GENES Y DE LAS ENFERMEDADES HUMANAS

El mayor uso de los organismos modificados genéticamente es la obtención de un mejor conocimiento sobre la función y regulación de los genes para su posterior aplicación en el conocimiento, prevención y tratamiento de las enfermedades humanas. Alrededor de unas 300.000 líneas de ratones transgénicos se obtendrán en las siguientes dos décadas (*Abbott* 2004) con este propósito.

Los animales transgénicos son usados para estudios de las patologías humanas como modelos en diferentes áreas: enfermedades genéticas, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, apoptosis celular, envejecimiento, arterioesclerosis, cáncer, xenotrasplantes, endocrinología, metabolismo y desarrollo reproductivo (*Houdebine* 2004).

El ratón hasta el momento ha sido el animal más utilizado como modelo de estudio para muchas de las enfermedades humanas. Sin embargo, en algunos casos las diferencias funcionales que existen entre ambas especies hacen que el modelo murino no sea el más adecuado. Este es el caso de los estudios sobre el metabolismo lipídico y los problemas asociados de arterioesclerosis. Por esta razón, los conejos transgénicos son extensamente usados para estudios de enfermedades humanas relacionadas con desordenes lipídicos (Fan & Watanabe 2003).

El cerdo podría ser un modelo muy adecuado para el estudio de determinadas enfermedades humanas. Sin embargo, hasta el momento, la producción de cerdos transgénicos ha sido más compleja y costosa que otros modelos animales como el conejo. Aún así, los cerdos transgénicos son utilizados para el estudio de otro tipo de enfermedades (Kues & Niemann 2004).

A continuación se exponen algunos ejemplos de la utilización de diversos animales transgénicos como modelos de estudio de enfermedades humanas:

- a) Genes implicados en el desarrollo del cáncer (oncogenes) y virus oncogénicos. Una variedad de oncogenes virales y celulares ha sido identificada como causante de cáncer en ratones transgénicos (Clarke 1994). Los animales transgénicos son una fuente para comprobar la influencia genética, fisiológica y del medio ambiente en el desarrollo del cáncer (Kemp 1997).
- b) Mecanismos de regulación del sistema inmunológico (Brinster *et al.* 1983; Alt *et al.* 1985; Bucchini 1987). Estas investigaciones son de gran valía para el estudio del SIDA causado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Pezen *et al.* 1991).
- c) Se pueden crear animales modificados genéticamente para que reproduzcan enfermedades humanas y así investigar nuevos posibles tratamientos para dichas enfermedades, tales como hipogonadismo o crecimiento anormal de las gónadas, distrofia muscular o *miastenia gravis*, desordenes sanguíneos (Paszty *et al.* 1995), etc. También existen ratones transgénicos que expresan antígenos de superficie de la hepatitis B y reproducen la enfermedad. Del mismo modo se han creado ratones transgénicos con la enfermedad de Alzheimer, por lo que minimizan el uso de primates en experimentación. Otros modelos de enfermedades son: diabetes, hiperplasia prostática, arterioesclerosis, retinoblastomas, fibrosis quística (Wagner *et al.* 1995; Wall 1996). Un ejemplo de la

utilización del cerdo transgénico como modelo de enfermedad es la producción de cerdos que presentan un cuadro equivalente a la retinitis pigmentosa humana (Petters *et al.* 1997). Estos animales expresan el gen mutado de la rodopsina (Pro347Leu) lo que hace que presenten de manera precoz una degeneración de los fotorreceptores de la rodopsina.

- d) Mecanismos y control del crecimiento. Tanto ratones, conejos, ovejas y cerdos transgénicos han sido usados como modelos para examinar el crecimiento (Brem *et al.* 1985; Ebert *et al.* 1988, 1991; Vise *et al.* 1988; Polge *et al.* 1989; Rexroad *et al.* 1989, 1991; Wieghart *et al.* 1990). El resultado final de tales experiencias, resultó en alteraciones tanto anatómicas como fisiológicas en los animales producidos.
- e) El gen GFP (*Green Fluorescent Protein*) ha sido transferido a la mayoría de las especies en las cuales la transgénesis es posible. Conejos que expresan GFP en todos los tipos celulares (Boulanger *et al.* 2002) están siendo usados para seguir los destinos celulares de embriones quiméricos, tal y como sucede en conejos normales en los cuales se han trasplantado órganos. Se prefieren para estos casos los conejos debido al mayor tamaño de sus órganos y mayor facilidad para su trasplante.

1.2.2 ÓRGANOS Y TEJIDOS DE CERDO PARA TRASPLANTES A HUMANOS

En la actualidad, los avances en la medicina han permitido que los trasplantes de órganos sea una práctica rutinaria. Sin embargo, no se dispone de los órganos humanos suficientes para cubrir las necesidades crecientes de los mismos. Por lo que las listas de espera son cada vez mayores y muchos pacientes mueren antes de que el órgano sea encontrado. Por ello son buscadas diversas alternativas entre las que se encuentran la posibilidad de utilizar órganos de animales, los llamados xenotrasplantes.

La transgénesis aparece no solo como una herramienta para el estudio de los mecanismos de rechazo, sino también el uso del cerdo como donante de órganos para humanos. En la actualidad, se están realizando estudios experimentales de los mecanismos de rechazo en ratón, conejo, ratas y en cerdos (Houdebine & Weill 1999).

Los cerdos son elegidos como potenciales donantes de órganos y células para humanos por diversas razones:

- Los órganos tienen un tamaño similar a los humanos
- La fisiología y anatomía no difieren en exceso de la humana
- Los ciclos reproductivos de los cerdos son relativamente cortos
- Crecimiento rápido
- Pueden mantenerse en condiciones higiénicas adecuadas a bajo precio
- Son animales domésticos

Los primates podrían ser probablemente mejores donantes pero estos animales tienen altas probabilidades de transmitir enfermedades infecciosas a los receptores. Estos animales además están protegidos por razones éticas y sus costes de producción son particularmente altos.

La idea de trasplantar órganos de animales a humanos no es reciente. La primera vez que se realizó fue hace un siglo, cuando se trasplantaron riñones procedentes de conejos como animales donantes (Pricentau 1905). El trasplante fue un éxito desde el punto de vista quirúrgico, pero el órgano trasplantado no sobrevivió más de 3 días y fue fuertemente rechazado. Estas primeras investigaciones fueron abandonadas hasta el descubrimiento de los inmunosupresores en la década de los 60, que permitió el estudio de los xenotrasplantes con órganos procedentes de primates no humanos. En 1964, *Reemtsma* realizó 12 xenotrasplantes renales utilizando el chimpancé (*Pan troglodytes*) como animal donante. A pesar de la intensa inmunosupresión a la que fueron sometidos (azatioprina, corticoides, actinomicina C e irradiación local), todos los pacientes presentaron varios episodios de rechazo agudo severo e infecciones. Uno de estos pacientes consiguió vivir hasta 9 meses con el riñón del chimpancé. Esto indica que al menos algunos de los mecanismos implicados en el rechazo de xeno-órganos son diferentes a los que operan en los alotrasplantes (Houdebine 2005). En la misma época, *Starzl* (1964) realizó otra serie de 6 xenotrasplantes renales utilizando el babuino (*Papio sp.*) como animal donante, con resultados similares a los obtenidos al usar los chimpancés. *Hardy* en 1964, llevó a cabo dos xenotrasplantes de corazón de chimpancé, pero ambos pacientes receptores fallecieron a las 24 horas. Se dedujo que el tamaño de los corazones de chimpancé era demasiado pequeño como para poder llevar a cabo una adecuada funcionalidad en una persona adulta. Posteriormente, *Barnard* en 1977, realizó 2 trasplantes a babuino donde se utilizó el chimpancé como donante. La supervivencia final fue de 4 días, y *Bayley* en 1985, trasplantó un

corazón de mandril (*Mandrillus sphinx*) a un recién nacido que vivió 20 días, falleciendo finalmente por un rechazo vascular agudo.

En cuanto a los xenotrasplantes hepáticos, los primeros fueron realizados por *Starzl* entre 1966 y 1974 (Husberg & Starzl 1974) utilizando como animal donante al chimpancé, cuya máxima supervivencia fue de 14 días. El mismo autor en 1993, logró una supervivencia de 26 y 70 días, usando al babuino como animal donante.

En cuanto al uso del cerdo como donante de órganos se refiere, *Czaplicki* en 1992, trasplantó por primera vez un corazón de cerdo a un paciente con síndrome de Marfan utilizando la perfusión *ex vivo* con otro corazón de cerdo lo que evitó el rechazo hiperagudo, pero a las 24 horas el paciente falleció por una insuficiencia cardíaca. Posteriormente, *Makowka* en 1994, realizó un xenotrasplante hepático siendo el cerdo el donante a un paciente con hepatitis autoinmune con una supervivencia de 30 horas tras el trasplante.

Si realizamos un estudio sistemático de los xeno-órganos observamos cómo hay varios mecanismos de rechazo que se suceden en el tiempo y cuyo conocimiento es clave para poder solventar el problema del rechazo:

- a) **Rechazo hiperagudo (HAR):** sucede a los pocos minutos, mediante la activación de la cascada del complemento.
- b) **Rechazo vascular agudo:** ocurre a los pocos días tras el trasplante.
- c) **Rechazo celular:** ocurre unos pocos días tras el trasplante. Durante este proceso la sangre del nuevo órgano es dañada por células T y destruyen el órgano. Este rechazo también ocurre tras el alotrasplante y normalmente puede ser controlado y/o suprimido mediante el empleo de sustancias inmunosupresoras.
- d) **Rechazo crónico:** es un proceso inmunológico complejo que resulta en el rechazo del órgano trasplantado tras varios años. La única terapia posible es un nuevo trasplante.

El estudio de los procesos que acontecen en cada una de las fases de rechazo permitirá el diseño y producción de cerdos transgénicos que reduzcan o eliminen la respuesta de rechazo.

Los primeros pasos fueron dirigidos a la producción de cerdos transgénicos que expresaran proteínas moduladoras de la respuesta en el rechazo hiperagudo, y en especial en la regulación de la cadena del complemento.

Estos animales transgénicos expresan los genes naturales del complemento antihumano, DAF, CD59, etc. (Houdebine 2005). Se han realizado estudios en los que se comparan el tiempo de rechazo en riñones de estos cerdos transgénicos y riñones control. Los transgénicos se mantienen viables de 2-12 semanas en monos tratados mediante terapias inmunosupresoras mientras que los controles fueron destruidos tras unos pocos días (Houdebine 2005). *Smolenski et al.* (2007), utilizaron corazones de cerdos control (no transgénicos) y transgénicos (hDAF) que fueron perfundidos *ex vivo* durante 4 horas con sangre humana fresca y monitorizándose la funcionalidad, el metabolismo y la estructura. Mostraron que los corazones de cerdos transgénicos (hDAF) producidos usando los espermatozoides como vectores de ADN exógeno (SMGT), fueron protegidos durante la perfusión con sangre humana y eran metabólicamente estables, además de mantener su función mecánica intacta.

Estos trabajos pioneros son una prueba de que el concepto de cerdos transgénicos podría ser una fuente de órganos para humanos en condiciones de conocer qué genes deben ser añadidos o eliminados del genoma del cerdo (Houdebine 2005).

A día de hoy, el mayor avance hacia el uso futuro de los xenotrasplantes, se realizó con la generación de cerdos *knockout* para α -1,3-galactosiltransferasa y que ha sido confirmado por dos estudios independientes (*Dai et al.* 2002; *Phelps et al.* 2003). Recientemente, el uso de corazones y riñones procedentes de estos cerdos mostraron una supervivencia muy alta cuando fueron trasplantados a primates no humanos (*Kuwaki et al.* 2005; *Yamada et al.* 2005). En la actualidad, el objetivo se centra en el estudio de otros genes envueltos en el segundo y tercer mecanismo de rechazo (rechazo vascular agudo y rechazo celular), lo que permitiría un gran avance en este campo.

En este camino, hay muchos pasos que realizar y uno de ellos es el de controlar la seguridad sanitaria del proceso de trasplante. En 2001, se observó que un retrovirus no patógeno porcino PERV podría transmitirse a algunas líneas celulares humanas mantenidas en cultivo. Un estudio pormenorizado de este fenómeno mostró que este virus tiene baja probabilidad de transmitirse a

humanos (Switzer *et al.* 2001). Pero este hecho hace pensar que la transmisión de patógenos desde órganos y tejidos de cerdo a pacientes no debe ser excluida.

1.2.3 ANIMALES TRANSGÉNICOS COMO PRODUCTORES DE PROTEÍNAS Y OTRAS BIOMOLÉCULAS DE USO TERAPEÚTICO

En siglos pasados nuestros antecesores, quienes usaban esencialmente extractos de plantas como fármacos, no podrían imaginar que las proteínas podrían jugar un papel tan importante en el tratamiento de los pacientes. En los últimos años, la utilización de las proteínas y otras biomoléculas ha pasado a jugar un papel fundamental en el tratamiento de las enfermedades humanas. En la actualidad, el mercado de las proteínas terapéuticas se encuentra en plena expansión (Pavlou & Reichert 2004), y algunos expertos confirman que la demanda de proteínas de uso farmacéutico está incrementándose de forma exponencial en la presente década, y los sistemas de producción tradicional son insuficientes para cubrir las necesidades de la creciente demanda (Houdebine 2005).

Las proteínas humanas pueden ser aisladas y purificadas a partir de sangre humana o de otros fluidos corporales, pero este método puede ser insuficiente. Además, debemos tener en consideración los riesgos que supone para los pacientes, y las limitaciones éticas que esta práctica lleva asociada (Houdebine 2005). La producción de biomoléculas mediante el empleo de microorganismos, como las bacterias y las levaduras, no siempre es efectiva, ya que estos microorganismos no pueden realizar ciertas modificaciones post-transcripcionales que son fundamentales para que estas proteínas sean plenamente funcionales. Por esta razón, la posibilidad de producir sustancias de alto valor biológico de uso terapéutico es una de las aplicaciones más prometedoras de la transgénesis animal y está asociada a un mercado económico que ha movido cifras extraordinarias (Wall *et al.* 1997; Miller 2002).

La idea de usar animales transgénicos como biorreactores emerge en 1982, cuando se demuestra que "el ratón transgénico gigante" presenta altas cantidades de la hormona del crecimiento humana en su sangre.

Ya en 1986, se piensa que la leche debería ser el mejor sistema animal para producir proteínas farmacológicas a una escala industrial y las especies ruminantes son los animales más adecuados. En el siguiente año se crean ratones en cuya leche se produce TPA (Factor Activador del Plasminógeno) humano y β -lactoglobulina ovina (revisado por Houdebine 2005). Desde entonces, se han producido otras muchas proteínas: factores sanguíneos, albúminas, enzimas, proteína de tela de araña, vacunas y principalmente anticuerpos monoclonales. Además, la producción de proteínas farmacéuticas y otros biomateriales en la leche de los animales domésticos no lleva asociada limitaciones éticas importantes. En la actualidad se están produciendo estas proteínas en la leche de de hembras diversas especies (conejas, ovejas, cerdas, vacas, cabras).

Alrededor de unas 100 proteínas han sido producidas experimentalmente en la leche, y de ellas entre 5 y 10 se encuentran en la actualidad en la fase de estudio clínico. Entre las proteínas que se han puesto recientemente o podrían ponerse en el mercado en los próximos años se encuentra la antitrombina III humana (Ebert *et al.* 1991; Meade 1999) que con el nombre comercial de Atryn[®] ya está aprobada en el ámbito europeo, Protexia[®] que es la enzima recombinante humana butirilcolinesterasa (BChE) que se vende como medida de defensa en la guerra química contra agentes nerviosos (Cerasoli *et al.* 2005), además existe una vacuna contra la malaria (Stowers *et al.* 2002), el inhibidor humano C1 (Koles *et al.* 2004), una vacuna contra el rotavirus (Soler *et al.* 2005), etc.

Pero en algunos casos, la purificación de las proteínas recombinantes de la leche no es tarea fácil, por lo que otros sistemas de producción de proteínas como la clara de huevo, el plasma seminal, glándulas de gusanos de seda, etc., podrían ser usados en un futuro, pero sin que existan hasta el momento evidencias claras de que proporcionen serias ventajas sobre la leche (Lubon 1998; Houdebine 2000, 2002; Nikolov & Woodard 2004). La posible transmisión de patógenos presentes en la leche a pacientes no parece un problema crucial aunque dichos riesgos pueden existir.

El cerdo se ha utilizado para la producción de fármacos y otros bioproductos. Entre las que destaca la producción de hemoglobina humana (Swanson *et al.* 1992; O'Donnell *et al.* 1993) y la producción del factor IX en la leche de las cerdas transgénicas (Lindsay *et al.* 2004) que podrá ser aplicado en breve para el tratamiento de la hemofilia tipo B.

1.2.4 MEJORA DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

La transgénesis es una herramienta aplicable a la mejora de la producción animal como los sistemas de selección genética convencional. Las aplicaciones prácticas de la transgénesis en la producción ganadera incluyen la mejora en la producción y composición de la leche, el aumento del índice de crecimiento, la mejora de la transformación de alimento y de la composición de la canal, la resistencia a enfermedades, la mejora de los parámetros reproductivos, destacando el incremento de la prolificidad, y la modificación de las características celulares y de los tejidos para investigaciones biomédicas (Wheeler & Choi 1997). La producción de cerdos transgénicos para la hormona del crecimiento sirve como un excelente ejemplo del valor potencial de esta tecnología (Brem *et al.* 1985; Hammer *et al.* 1985).

La mejora del crecimiento y supervivencia de los animales de granja a través de la **modificación de las características de la leche**, requiere la producción de animales transgénicos que produzcan leche: 1) en mayor cantidad, 2) con un alto contenido de nutrientes, 3) y/o que contenga proteínas con un efecto beneficioso. En algunas especies de producción como la cabra y oveja, los nutrientes que la madre aporta a sus crías no están limitados, sin embargo, la producción de leche en las cerdas limita el crecimiento de los lechones y por lo tanto la producción porcina (Hartmann *et al.* 1984). Se han creado cerdos transgénicos que contienen el gen bovino α -Lactoalbúmina (α -LA), mediante el cual se mejora la producción y composición de la leche en las cerdas, incrementando hasta un 50% de la concentración total de esta proteína (Bleck *et al.* 1998). La expresión de este transgén lleva asociado un incremento en la producción de leche y un aumento en el índice de crecimiento (Noble *et al.* 2002).

Otro mecanismo por el cual la alteración de la composición de la leche puede afectar el crecimiento del animal es la adición o suplementación de hormonas beneficiosas, factores de crecimiento o factores bioactivos a la leche (Wheeler & Walters 2001). Estas proteínas influyen en el crecimiento, como es el desarrollo y maduración del sistema digestivo, del sistema inmune y de los órganos endocrinos (Grosvenor *et al.* 1993). Otras propiedades de la leche que pueden ser modificadas son las que afectan a la salud. Se sabe que anticuerpos específicos pueden ser producidos en animales transgénicos (Storb 1987), y por tanto es posible producir anticuerpos en la glándula mamaria capaces de

prevenir las mastitis en ruminantes y el síndrome MMA (Metritis-Mamitis-Agalaxia) en cerdos (Pursel & Rexroad 1993a).

Se han realizado diversos estudios en cuanto a la **mejora del crecimiento y composición de la canal** mediante el uso de animales transgénicos. La hormona del crecimiento y la insulina han sido incorporadas como factor de crecimiento y expresadas en varios niveles en animales transgénicos (Seamark 1987). Los resultados de estos estudios muestran que un incremento en la hormona del crecimiento mejora el crecimiento y la conversión alimenticia en cerdos aunque se acompaña de efectos secundarios como la artritis y el crecimiento esquelético anormal (Pursel *et al.* 1990). Mejoras similares se han conseguido con el gen de la hormona del crecimiento porcina, pero sin los problemas de salud antes descritos (Vise *et al.* 1988). Otra alternativa fue la introducción del oncogén "ski" de pollos, que causa hipertrofia muscular y reduce la proporción de grasa en la canal (Sutrave *et al.* 1990). Sin embargo, el éxito de esta investigación resultó limitado en algunos cerdos transgénicos (Pursel *et al.* 1989) y cabras transgénicas (Bowen *et al.* 1994). El proyecto donde se ha obtenido un mayor avance ha sido sin duda el rápido crecimiento de los peces debido a copias adicionales del gen de la hormona del crecimiento. En la actualidad, numerosas especies, salmón, trucha, carpa... se encuentran bajo estudio, y nada parece indicar que estos productos puedan acarrear algún tipo de problema para el consumidor humano. Es posible que la autorización para poner en el mercado estos peces transgénicos podría producirse en los próximos años (Muir 2004).

Por otra parte, la **lucha contra las enfermedades** aparece como un importante objetivo a conseguir con el uso de los animales transgénicos, esto podría: (1) reducir el uso de medicamentos y particularmente de antibióticos en algunos casos, (2) mejorar las condiciones de bienestar animal, (3) mejorar las tareas reproductivas y (4) reducir la frecuencia de transmisión de enfermedades animales a humanos (zoonosis). Debemos hacer especial hincapié en la posibilidad de conseguir animales transgénicos resistentes a enfermedades debido al gran interés que esto supondría, no solo a la comunidad científica sino también al ganadero. Los procesos infecto-contagiosos en las granjas suponen costes entre un 10-20% de la producción total (Müller *et al.* 1997). Por lo que un paso biotecnológico de gran importancia consistiría en la inmunización de los animales por medio de la transferencia de ADN mediante la producción de animales transgénicos. Un ejemplo específico donde la transgénesis ha sido aplicada para la resistencia de enfermedades es la producción de cerdos

resistentes al virus de la influenza. Líneas celulares de fibroblastos procedentes de ratones transgénicos mostraron resistencia a la infección por este virus (Haller *et al.* 1981; Staeheli *et al.* 1986). También se han creado cerdos transgénicos resistentes a la infección por influenza (Brenig *et al.* 1990). Otro ejemplo son los ratones transgénicos con anticuerpos monoclonales que neutralizan el virus de la gastroenteritis transmisible, estos anticuerpos son secretados en la leche, dando lugar a la protección de la descendencia para esta enfermedad (Castilla *et al.* 1998).

Se ha demostrado en ratones transgénicos, y esperamos que en un futuro cercano también en cerdos, una forma soluble del virus de la pseudorrabia que los protegería de la enfermedad de Aujeszky (Ono *et al.* 2004). Así como la producción de vacas con inactivación de los genes de priones (PrP) podrían prevenir enfermedades donde actúen los priones (Kuroiwa *et al.* 2004).

Por otra parte, se han desarrollado animales transgénicos que producen en la leche proteínas con actividad antibacteriana: lactoferrina humana (Zuelke 1998), lisostafina (Mitra *et al.* 2003) y lisozima humana (Murray *et al.* 2003). Estas proteínas se esperan que en un futuro no muy lejano, protejan tanto a consumidores como a las glándulas mamarias de los animales contra infecciones bacterianas.

Del mismo modo, los antígenos de rotavirus VP2 y VP6 han sido producidos en leche de conejo, y extractos de esta leche pueden usarse para vacunar niños y animales a gran escala (Soler *et al.* 2004).

Otros ratones transgénicos expresan el gen de la lactasa en su leche, reduciéndose de tal modo el contenido de la lactosa, a la cual una parte de la población humana es intolerante (Jost *et al.* 1999). Cerdos transgénicos que secretan en su leche α -Lactoalbúmina bovina o IGF1 tienen una alta capacidad para alimentar a sus crías (Bleck *et al.* 1998). Cerdos transgénicos expresando el gen de D-12-ácido graso desaturasa contienen más ácido linoleico en sus adipocitos (Saeki *et al.* 2004).

Otro aspecto a tener en cuenta es la **reducción de la contaminación ambiental**. El principal problema de la producción porcina es la gestión de los purines debido a su alto grado de contaminación, principalmente por la presencia de altas cantidades de fósforo, que es un limitante en la utilización de los purines como abono en las cosechas. Con el objetivo de solucionar este problema, en el

año 2001, se crearon cerdos que expresaban el gen de la fitasa de *Escherichia coli* en su saliva secretando un 75% menos de fosfato mineral con la consecuente reducción de la contaminación (Golovan *et al.* 2001).

1.3 TRANSGÉNESIS: PERSPECTIVAS Y FUTURO

Hoy en día existe un número de nuevas tecnologías que tendrán un profundo impacto en la mejora genética de la ganadería. Los recientes avances en biotecnología de la reproducción y las herramientas en biología molecular abren una nueva era en producción animal (Wheeler *et al.* 2003). Para alcanzar estos objetivos será necesario el continuo avance en el campo de la biotecnología de la reproducción y el conocimiento del mapa genético (Niemann *et al.* 2003).

La tecnología de la transgénesis ya está disponible en el ámbito comercial, existen alimentos transgénicos disponibles desde hace años en muchos países, son alimentos de origen vegetal como maíz, soja, colza, calabazas y patatas (en EE.UU. el 70% de los alimentos procesados contienen maíz modificado genéticamente). La OMS lleva un estricto control sobre estos productos evaluando que no sean tóxicos, las posibles alergias, la estabilidad del gen insertado, los efectos nutricionales y cualquier posible efecto no deseado. Los cultivos de estos productos resisten las plagas y los herbicidas, por lo cual por similitud podrán producirse en un futuro animales resistentes a enfermedades, siendo el principal problema la aceptación por parte del consumidor de estos productos.

Por otra parte, no hemos de perder de vista los problemas que pueden llevar asociados la producción de animales transgénicos. Las plantas (tanto transgénicas como no) suponen un bajo riesgo de transferir patógenos a los humanos. El caso de los animales es diferente y el riesgo de transmisión de enfermedades debe ser valorado con cautela.

Además, está el problema de la diseminación descontrolada del nuevo material genético. En este sentido, las plantas son cultivadas en campos abiertos y una diseminación descontrolada del transgén podría provocar riesgos en algunos casos. Esta situación no es extrapolable para la mayoría de los animales de granja, ya que estos se encuentran confinados. Sin embargo, los animales acuáticos y las aves podrían colonizar grandes áreas sin un control posible. Esta cuestión ha sido estudiada y discutida por Muir (2004). Este estudio revela que

los peces de crecimiento rápido son maduros sexualmente antes que los controles. Además, este crecimiento rápido repercute en la posible extinción local de algunas especies. El completo aislamiento de estos peces en granjas o la esterilización de los animales podrían solventar este problema.

Según *Wheeler et al.* (2003), la finalidad de la producción de animales transgénicos es incrementar nuestro conocimiento en las ciencias biológicas y biomédicas y nuestra eficiencia en la producción de leche, carne y fibras. El éxito final de la transgénesis está limitado por nuestra habilidad para identificar genes y tener apropiadas secuencias reguladoras de nuestro interés, y la tecnología para la incorporación y regulación de dichos genes de forma apropiada en los animales de granja. Sin embargo, existen varios problemas:

- a) Falta de conocimiento de los elementos reguladores necesarios para la expresión del gen.
- b) Diversidad de expresión del transgén dependiendo del lugar de integración.
- c) Diversas funciones fisiológicas de los productos génicos específicos.
- d) Posibilidad de alteraciones fisiológicas generales en animales transgénicos.

1.4 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

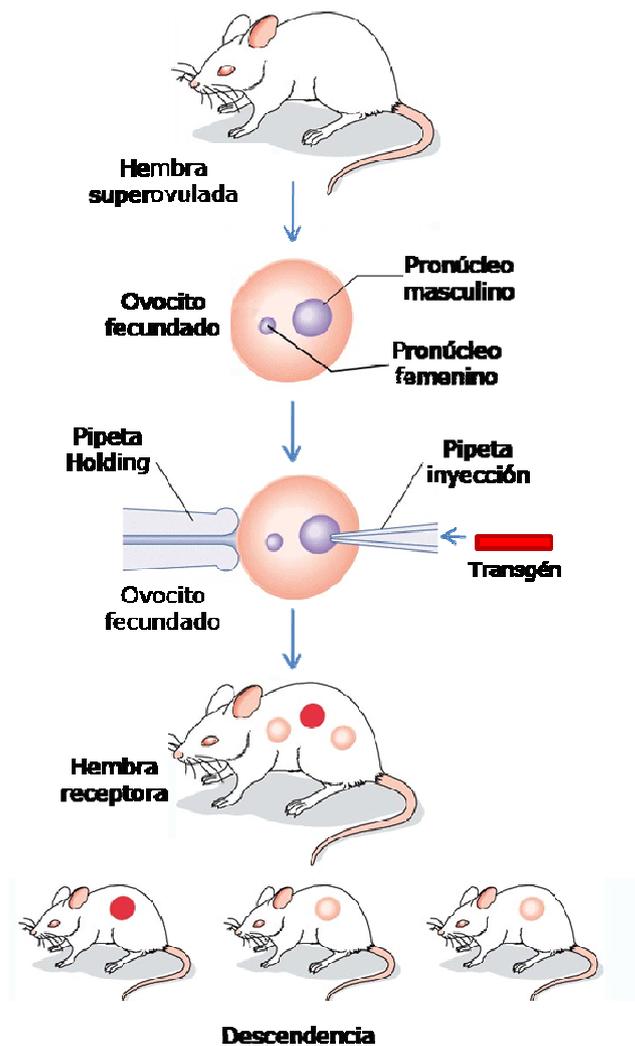
Se han desarrollado numerosas y diferentes estrategias para crear animales que lleven en su genoma ADN exógeno integrado de una manera estable y capaz de transmitirlo a su descendencia. A continuación, se describen brevemente los métodos más utilizados para la creación de animales transgénicos:

1.4.1 MICROINYECCIÓN PRONUCLEAR

Mediante esta técnica se creó el primer animal transgénico por *Gordon & Ruddle* en 1981, basándose en la microinyección de genes directamente en el pronúcleo de ovocitos de ratón recién fecundados (*Figura 1*). Esta técnica ha sido la más usada y con más posibilidades de éxito en la producción de ratones

transgénicos, y ha permanecido sin cambios prácticamente desde hace 25 años (Brinster *et al.* 1981; Costantini & Lacy 1981; Wagner *et al.* 1981; Brem *et al.* 1985; Hammer *et al.* 1985).

FIGURA 1. Esquema de la microinyección pronuclear. Pasos a seguir para la introducción de ADN exógeno en el pronúcleo masculino.



En los animales domésticos la eficiencia de esta técnica es menor que en los ratones debido a algunos factores como son la difícil visualización de los pronúcleos, la disponibilidad de ovocitos recién fecundados, y la sincronización entre animales receptores y donantes (Martin & Pinkert 1994). La eficiencia de esta técnica varía según las especies: 1-3% caprino (Gavin 1997), 0.3-0.4% cerdos (Pursel 1997), 0.1-4.4% ovinos, 0.7-3.2% bovinos (Gagné *et al.* 1997). El rendimiento de la microinyección puede ser mejorado añadiendo la

recombinasa RecA al ADN (Maga *et al.* 2003). Debido a la baja eficiencia de esta técnica se han requerido del desarrollo de otras técnicas para aumentar las tasas de integración del transgén. Además, esta técnica presenta otras limitaciones importantes, como son: (1) imposibilidad para producir *knockouts* por recombinación homóloga, (2) ineficiencia en la producción de embriones en los cuales el ADN inyectado fue integrado en el genoma hospedador (Nottle *et al.* 2001), (3) producción de embriones transgénicos quiméricos resultando en un animal mosaico (Keefer 2004), (4) el sitio de integración del transgén es impredecible, resultando en una variación de la expresión del transgén (Clark *et al.* 1994).

1.4.2 TRANSFERENCIA DE ADN USANDO VECTORES VIRALES

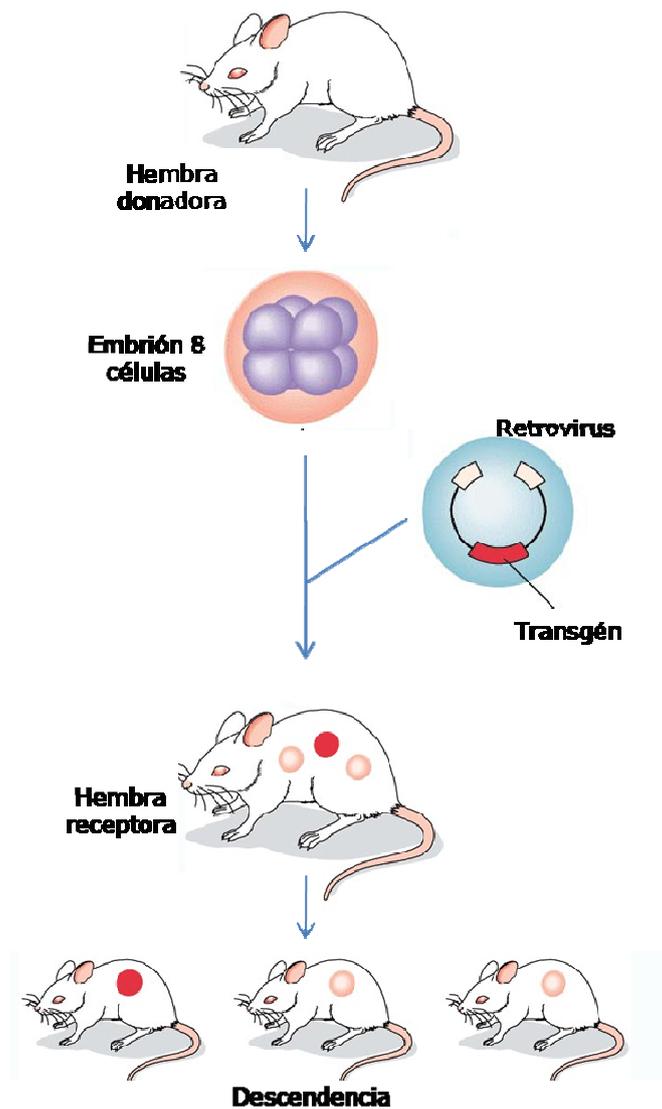
Una alternativa a la microinyección pronuclear es el uso de virus (retrovirus, lentivirus...) que inserten genes exógenos en su genoma (*Figura 2*). El retrovirus actúa como un sistema natural de transferencia de ADN a varios tipos de células (Varmus 1998). Esta transferencia puede llevarse a cabo de diversas formas, como son la exposición de las células a una alta concentración de virus, por co-cultivo en monocapa de células infectadas con retrovirus, y mediante la microinyección de retrovirus directamente en blastocistos de aves (Pursel & Rexroad 1993b).

La principal ventaja del uso de virus como vectores es la posibilidad de transferencia de los retrovirus a embriones en estadios más avanzados de desarrollo, a diferencia de la microinyección pronuclear. Como desventajas cabe destacar la inestabilidad de los vectores, la difícil manipulación de los retrovirus y la posibilidad de que el animal resultante sea un mosaico. Además, el tamaño del fragmento de ADN introducido queda limitado a unos 8-9 Kpb (Houdebine 2005), e incluso, debido a la inestabilidad de estos vectores, pueden ocurrir problemas de expresión del gen.

En el porcino, el uso de virus comienza con el uso de retrovirus aviares que permite la infección de blastocistos (Petters *et al.* 1989). Posteriormente, Farre *et al.* (1999), mediante el uso de adenovirus y por medio de la fecundación *in vitro* e inseminación artificial, han obtenido embriones y lechones transgénicos respectivamente. En los últimos años, se ha desarrollado el uso de los lentivirus (Hofmann *et al.* 2004) que ofrece mayor seguridad que los retrovirus y ha

permitido la generación de cerdos transgénicos utilizando el lentivirus de la anemia infecciosa equina (Whitelaw *et al.* 2004).

FIGURA 2. Representación gráfica de la transferencia de ADN usando vectores virales.



1.4.3 CÉLULAS EMBRIONARIAS INDIFERENCIADAS (“EMBRYONIC STEM” CELLS-ES) Y CÉLULAS EMBRIONARIAS GERMINALES (“EMBRYONIC GERM” CELLS-EG)

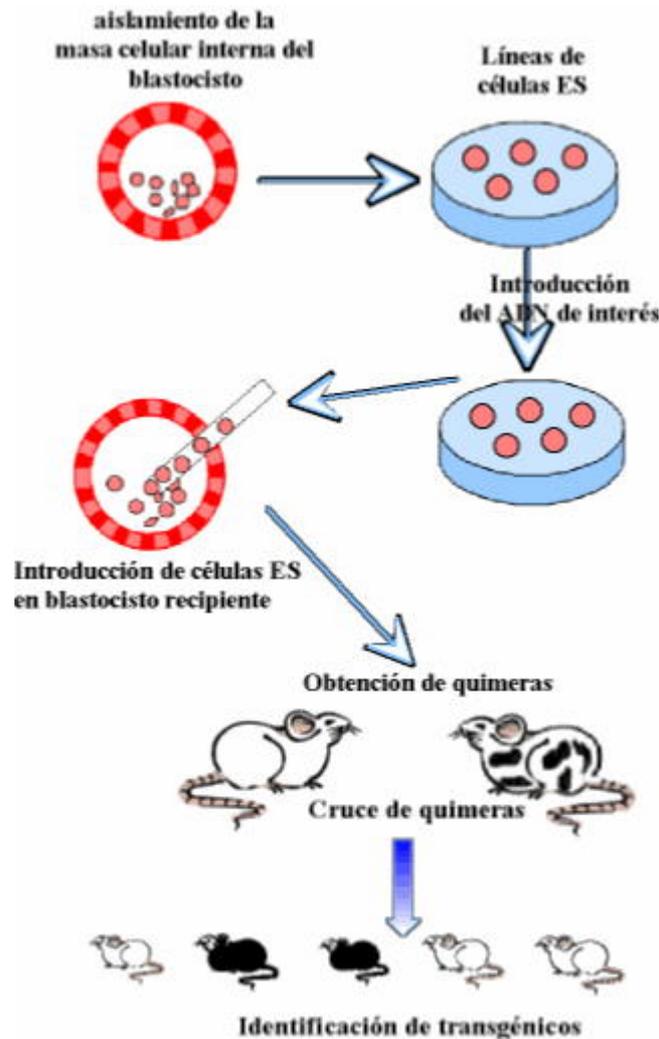
Las células embrionarias indiferenciadas (Embryonic stem cells-ES) se establecen *in vitro* a partir del cultivo de células procedentes de embriones en estadio de blastocisto. Estas células mantienen sus características de pluripotencia y conservan su cariotipo normal cuando son cultivadas *in vitro* (Wagner *et al.* 1983). Los genes pueden ser introducidos eficientemente en las células por transferencia directa de ADN, electroporación, lipofección o por medio de retrovirus. Estas células pueden ser inyectadas posteriormente dentro de un blastocisto receptor colonizando el embrión y formar la línea germinativa originando un animal quimérico con células portadoras del gen exógeno (Robertson *et al.* 1986) (Figura 3). La posibilidad de una selección previa *in vitro* de un genotipo en particular antes de la introducción de las células en el embrión constituye la principal ventaja de esta técnica. Sin embargo, la gran desventaja que presenta es que no se puede prever el destino de las células ES. Otro factor a tener en cuenta es que los animales producidos por esta técnica son quiméricos siendo necesarios cruzamientos para la obtención de una línea transgénica pura (Gordon 1989; Pursel & Rexroad 1993b). Con esta técnica se han producido animales transgénicos en diferentes especies entre las que destacamos bovinos transgénicos quiméricos (Cibelli *et al.* 1998b).

Las células embrionarias germinales (Embryonic germ cells-EG) son otro tipo de células totipotentes, derivadas de células germinales primordiales que darán lugar a ovocitos y a espermatozoides en el animal adulto. Estas líneas celulares han sido descritas en ratón (Resnick *et al.* 1992; Matsui *et al.* 1992), cerdos (Shim *et al.* 1997; Piedrahita *et al.* 1998) y en humanos (Shablott *et al.* 1999). El protocolo de creación de animales transgénicos a partir de células EG es similar al descrito para las células ES.

En porcino se han generado animales quiméricos por medio de la infección de células ES o células germinativas primordiales (Notarianni *et al.* 1991; Wheeler 1994; Wheeler *et al.* 1995). Estos últimos autores, demuestran que hasta un 86% de los embriones porcinos que recibieron células ES sobrevivieron a la micromanipulación. En otro estudio, de 29 lechones nacidos procedentes de transferencia de embriones creados por ES, 15 de ellos fueron quimeras

(Wheeler & Walters 2001). Los resultados de estos estudios muestran la fiabilidad de utilizar células ES en programas para la generación de cerdos transgénicos.

FIGURA 3. Esquema gráfico de la obtención de ratones transgénicos mediante la creación de líneas celulares ES.



1.4.4 LIPOFECCIÓN

Esta técnica consiste en la introducción de copias de ADN en células y embriones mediante el uso de liposomas, que son pequeñas vesículas formadas por membranas lipídicas que protegen el ADN exógeno de la digestión de las proteasas y DNAsas (Felgner *et al.* 1987). Uno de los componentes más

utilizados para la formación de los liposomas es la lipofectina que es capaz, de manera espontánea o por sonicación, de interaccionar con moléculas de ADN dando lugar a complejos ADN-lípido. Cuando estas vesículas se colocan en contacto con las células que quieren ser transformadas, se produce una fusión con la membrana plasmática de las células siendo el ADN transferido dentro del citoplasma. Esta técnica ha sido utilizada en embriones de gallina (Muramatsu *et al.* 1997b). En porcino se han utilizado estos complejos ADN-liposomas para la transferencia genética en diferentes tejidos, como corazón (Aleksic *et al.* 1997), páncreas (Benhamou *et al.* 1997). Mientras que Lai *et al.* (2001), utilizan liposomas para mejorar la interacción del ADN exógeno con los espermatozoides, para la posterior producción de embriones transgénicos.

1.4.5 ELECTROPORACIÓN

Este método consiste en la exposición de las células durante unos microsegundos con una corriente eléctrica de alto voltaje, dando lugar a la formación de poros en la membrana citoplasmática que permite el paso de macromoléculas como el ADN (Reiss *et al.* 1986; Tur-Kaspa *et al.* 1986; Inoue *et al.* 1990; Gagné *et al.* 1991; Puchalski & Fahl 1992; Whitmer & Calarlo 1992). Entre sus ventajas encontramos la facilidad y repetitividad, la aplicación a células en crecimiento en capas o en suspensión, y la posibilidad de controlar el número de copias de ADN transferidas.

Muramatsu *et al.* (1997a, 1998) utilizaron esta técnica para la transferencia de genes a embriones de gallina. La electroporación también ha sido utilizada en espermatozoides de bovino (Gagné *et al.* 1991) y porcino (Horan *et al.* 1992a). Estos llevarían el ADN exógeno al interior del ovocito durante la fecundación (Gagné *et al.* 1991; Horan *et al.* 1992a) y en líneas embrionarias indiferenciadas de ratón (Wurst & Joyner 1993) han dado lugar a ratones transgénicos (Camper *et al.* 1995).

1.4.6 BIOLÍSTICA

Otra técnica relativamente novedosa es la biolística que consiste en el bombardeo de microproyectiles de ADN u otras moléculas en tejidos y células (Sanford *et al.* 1991), mediante la aceleración de micropartículas de metal a una alta velocidad. Zelenin *et al.* (1989) realizaron el primer trabajo de biolística en

ratones confiriendo resistencia a los antibióticos. *Li et al.* (1995) obtuvieron el primer animal transgénico mediante biolística donde células germinativas primordiales de embriones de gallina fueron bombardeados con dos tipos de genes diferentes.

Entre las aplicaciones de esta técnica destacamos: el análisis de expresión de genes, la terapia e inmunización genética y la producción de células y animales transgénicos (Klein & Fitzpatrick-McElligott 1993; Oliveira *et al.* 2000; Sato *et al.* 2000), siendo las ventajas de esta técnica diversas como son el bombardeo simultáneo de muchas células, la liberación de altas dosis de ADN, el uso de uno o varios plásmidos, la independencia respecto al uso de protocolos de cultivos de tejidos, la relativa eficiencia de la técnica (Klein *et al.* 1992; Sanford *et al.* 1993; Biewenga *et al.* 1997).

1.4.7 TRANSFERENCIA NUCLEAR (NT)

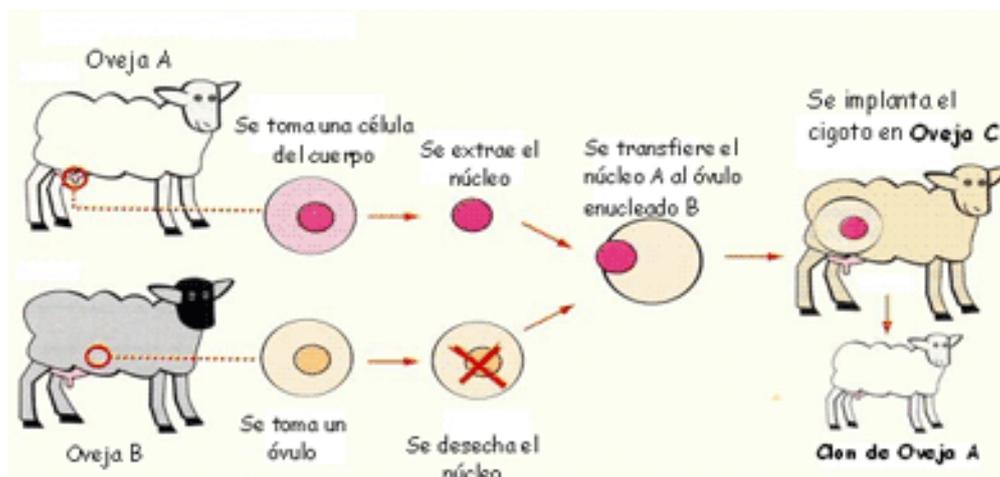
Desde el nacimiento de la oveja "Dolly" (Wilmut *et al.* 1997), la transferencia nuclear comenzó a ser considerada como otra tecnología aplicable para la producción de animales transgénicos. En términos generales dicha técnica consiste en la transferencia del material genético de una célula donante (carioplasto) a una célula receptora (citoplasto). En nuestros animales domésticos se utiliza como citoplasto, el citoplasma de ovocitos madurados *in vitro* o *in vivo*, mientras el carioplasto pueden ser células adultas diferenciadas, células embrionarias o células fetales. La célula enucleada y el núcleo donante son unidos mediante electrofusión, tras lo cual la célula es activada por estimulación eléctrica o química, se llevan a cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto y finalmente se transfiere a una hembra receptora (*Figura 4*). Esta técnica es utilizada para la producción de animales genéticamente iguales a los donantes llamados **clones**. Las ventajas que presenta esta técnica son diversas:

- 1) Elimina los problemas asociados a la inserción al azar de los genes.
- 2) Permite el uso de un amplio rango de células como son líneas celulares embrionarias, células fetales y células somáticas adultas (Van Reenen *et al.* 2001).
- 3) Permite crear modelos biológicos *knock out* para el estudio de enfermedades animales y humanas.

- 4) Se puede aplicar a la producción de animales domésticos de alta calidad genética (Wilmut *et al.* 1998; Polejaeva & Campbell 2000).

Se ha obtenido descendencia viva a partir de clones de núcleos embrionarios en ratones, ratas, conejos, cerdos, ovejas, vacas y monos "*Rhesus*" (Schnieke *et al.* 1997; Cibelli *et al.* 1998a, 1998b; Meng *et al.* 1997). Por transferencia nuclear de células adultas se han obtenido ovejas (Wilmut *et al.* 1997; McCreath *et al.* 2000), ratones (Wakayama *et al.* 1998; Wakayama & Yanagimachi 1999), bovinos (Kato *et al.* 1998; Wells *et al.* 1999) y porcinos (Polejaeva & Campbell 2000).

FIGURA 4. Esquema de obtención de ovejas clónicas a partir de células somáticas.



Una variante de esta técnica sería la transferencia de ADN en las células somáticas usando la generación de animales transgénicos por clonación, aunque es más laborioso, es más eficaz que la microinyección pronuclear para obtener rumiantes transgénicos (Schnieke *et al.* 1997; Cibelli *et al.* 1998a).

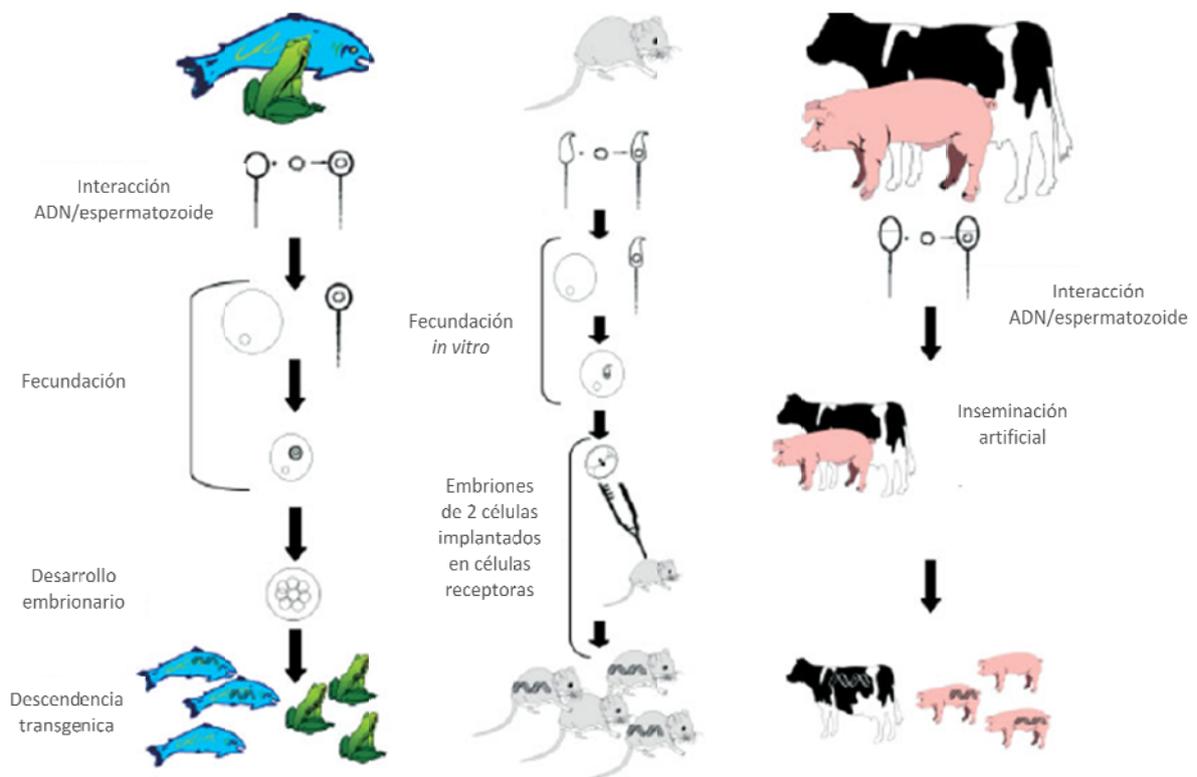
1.4.8 TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES (SMGT)

La capacidad de las células espermáticas de conejo para capturar ADN exógeno fue descrito por primera vez por Brackett *et al.* (1971). Este

descubrimiento y sus importantes implicaciones fueron ignoradas durante casi 20 años, siendo redescubiertas con la publicación del artículo científico: "*Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice*". *Cell. Lavitrano et al. 1989*.

Los espermatozoides de los mamíferos tienen la capacidad de unirse al ADN exógeno y su uso ha permitido la generación de animales transgénicos. Ésta técnica (*Figura 5*) se presenta como una alternativa para la producción de animales transgénicos debido a su relativa simplicidad y a la alta eficiencia ya que se llegan a alcanzar niveles de expresión del transgén de hasta el 94% de los embriones analizados (Perry *et al.* 1999; Chan *et al.* 2000a, 2000b).

FIGURA 5. Rutas para la producción de animales modificados genéticamente vía SMGT en diferentes especies (Smith & Spadafora 2005).



1.5 TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES (SMGT)

1.5.1 INTRODUCCIÓN. BREVE HISTORIA DE LA SMGT

Bracket et al. (1971) fueron los primeros en demostrar que los espermatozoides de los mamíferos tienen la habilidad intrínseca de unirse al ADN exógeno. Posteriormente, en 1989, *Lavitrano et al.* usando el ratón como modelo, demostraron la posibilidad de utilizar espermatozoides como vectores para introducir ADN exógeno durante la fecundación para producir animales transgénicos. Este hecho generó un gran interés porque se proponía un nuevo método de producir animales transgénicos "la transferencia de ADN mediada por espermatozoides" siendo una técnica simple y de bajo coste. Sin embargo, las dificultades en la repetitividad y la baja eficiencia en la integración de los transgenes en el genoma del animal, resultó en una considerable controversia sobre dicho trabajo durante numerosos años (*Brinster et al.* 1989; *Birnstiel & Busslinger* 1989). No obstante, recientemente se han publicado numerosos estudios confirmando que los espermatozoides de múltiples especies pueden ser usados como vectores para introducir transgenes dentro del genoma del animal (*Smith & Spadafora* 2005). Entre los diferentes animales donde se ha comprobado la aplicabilidad de esta técnica se encuentran el ratón (*Lavitrano et al.* 1989; *Hochi et al.* 1990; *Bachiller et al.* 1991; *Maione et al.* 1998; *Sciamanna et al.* 2000; *Sato et al.* 2002), conejo (*Brackett et al.* 1971; *Kuznetsov & Kuznetsov* 1995; *Wang et al.* 2001), cerdo (*Sperandio et al.* 1996; *Gandolfi et al.* 1998; *Lavitrano et al.* 2002; *Nagashima et al.* 2003), pollo (*Fainsold et al.* 1990; *Yang et al.* 2004), rana (*Xenopus Laevis*) (*Kroll & Amaya* 1996; *Jonak* 2000), vacuno (*Pérez et al.* 1991; *Sperandio et al.* 1996; *Rieth et al.* 2000) y en algunas especies de peces (*Sin et al.* 2000; *Venugopal et al.* 2004).

En este sentido, se han observado diferencias en la eficiencia del transporte de los espermatozoides de ADN exógeno y la generación de animales transgénicos. Así, en cerdos se ha logrado una alta eficiencia con esta técnica obteniéndose, en algunos estudios, resultados que muestran que más del 80% de la descendencia eran transgénicos (*Lavitrano et al.* 2002), mientras que el éxito fue más limitado en la producción de cabras transgénicas (*Schellander et al.* 1995). Las causas de las diferencias entre laboratorios y entre especies no están todavía claras, y en consecuencia, la SMGT, aún siendo una técnica muy

prometedora, no ha sido del todo adoptada para la creación de animales transgénicos.

La literatura científica contiene numerosas publicaciones acerca de la interacción entre ADN y los espermatozoides (*Ver tabla 1 y 2*). Gran parte de estos artículos muestran evidencias de fecundaciones mediante SMGT, y además la mayoría de ellos obtienen como consecuencia generaciones F₀ de animales viables, y en algunos casos está demostrada la transmisión del transgén a la descendencia.

Los espermatozoides que transportan el ADN pueden utilizarse para fecundar ovocitos *in vitro* (FIV) o *in vivo* mediante inseminación artificial (IA), o en el caso de animales acuáticos mediante fecundación vía acuática. La electroporación y utilización de liposomas han complementado esta técnica (*Ver tabla 1 y 2*), favoreciendo la unión de los espermatozoides a los transgenes (Lai *et al.* 2001). Estudios más recientes han introducido el ADN exógeno directamente en el testículo de los machos, simplemente ADN o ADN unido a liposomas (Celebi *et al.* 2003). Esta forma de SMGT se conoce como "*testis mediated gene transfer*" (TMGT), los espermatozoides captan los transgenes *in vivo* y pueden ser transferidos a las hembras mediante monta natural o por inseminación artificial. Otra innovación reciente en la SMGT ha sido el uso de la ICSI, introduciendo directamente los espermatozoides con el transgén en los ovocitos (Perry *et al.* 1999; Moreira *et al.* 2004).

En la *tabla 1*, queda reflejada esquemáticamente la historia de la SMGT desde que fue descubierta allá por el año 1971, considerando las diferentes especies donde se ha utilizado, el método de fecundación y el año (revisado por Smith & Spadafora 2005).

1.5.2 INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-ADN EXÓGENO

1.5.2.1 Aspectos técnicos de la SMGT

Los primeros experimentos llevados a cabo para la producción de animales transgénicos con el método de SMGT, fueron realizados en ratón usando células espermáticas de epidídimo. Estos experimentos acarrearón dos problemas: (1) la falta de repetitividad en diferentes laboratorios y (2) distinguir entre los patrones de las bandas del transgén (Wall 1999). La utilización de espermatozoides de epidídimo supone un claro limitante ya que el del animal donante sólo puede utilizarse una vez. Sin embargo, el uso de los espermatozoides eyaculados permite el empleo de los mismos animales durante toda la vida reproductiva del animal. Además, la utilización de técnicas de criopreservación permite conservar durante largos periodos los espermatozoides epididimarios o eyaculados.

Para optimizar la técnica de SMGT existen dos parámetros importantes a tener en consideración: (1) Calidad del semen; (2) Capacidad de capturar ADN, (Lavitrano *et al.* 2003). La calidad espermática está influenciada por numerosos factores como la estación del año (la calidad seminal disminuye en las épocas de calor), ritmo de recogida del eyaculado al que esté sometido el animal, edad del animal donante, etc. Pero uno de los factores principales es el efecto individual (macho) por tanto elegir un buen donante requiere un gran esfuerzo pero una vez elegido puede ser útil durante años.

En relación a la calidad seminal, la motilidad inicial debe ser de al menos un 80% y no menos de un 65% al finalizar el proceso de lavado. La habilidad para captar el ADN e interiorizarlo dentro del núcleo se correlaciona con la calidad seminal, sobre todo en términos de motilidad progresiva tras el procedimiento de lavado (Lavitrano *et al.* 2003). La presencia de ADN exógeno, al menos en mamíferos, no genera interferencias con los parámetros fisiológicos seminales, como la motilidad o motilidad progresiva. En algunos casos, los espermatozoides tratados mejoran sus características en relación a las células no tratadas (Chan 2000).

Lavitrano *et al.* (2003) seleccionaron nueve machos como posibles donantes. En la *figura 6* se muestra a lo largo del tiempo la unión del ADN a los espermatozoides de dichos machos, mostrando claras diferencias en la interacción con el ADN, aunque la cinética de unión es similar en todos los casos

donde se produce una rápida unión durante los primeros 15-30 min, a partir de este tiempo la unión permanece constante.

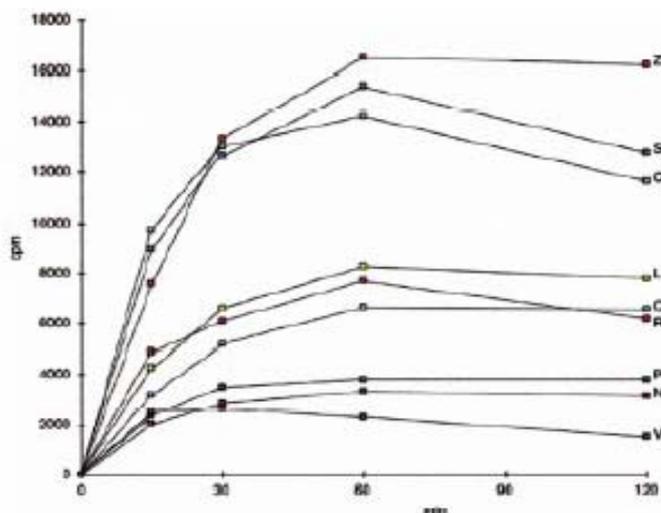


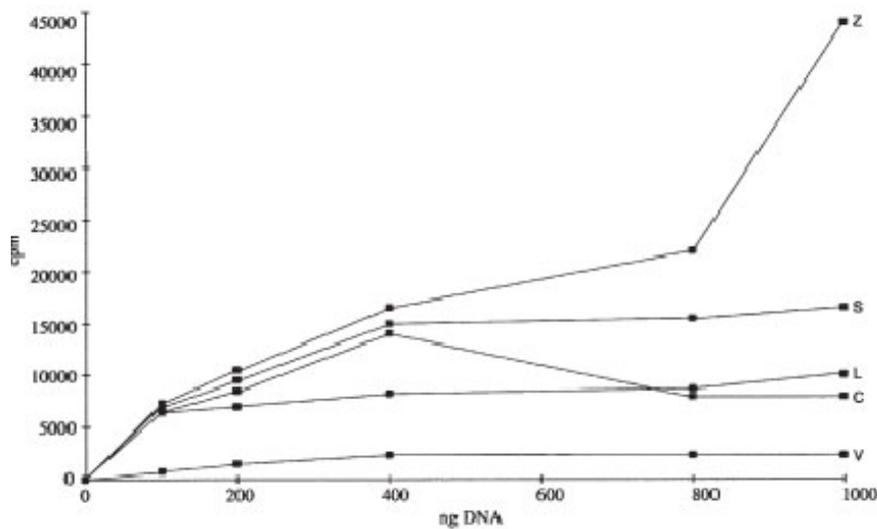
FIGURA 6. Unión entre ADN y espermatozoides de 9 machos diferentes (Lavitrano *et al.* 2003). El porcentaje de unión es diferente según los machos utilizados aunque la cinética de unión es similar.

La curva de unión mostrada en la grafica anterior es muy similar a la obtenida por *Sperandio et al.* (1996), cuando comparan la cinética de unión en diferentes especies (ratón, cerdo y toro), obteniendo como resultado que la interacción máxima entre espermatozoides y el transgén ocurre en los primeros 30 min de incubación, siendo los patrones de unión a lo largo del tiempo similar en las especies estudiadas.

Para optimizar el protocolo de generación de animales transgénicos, el grupo de *Lavitrano et al.* estableció en qué momento, durante cuánto tiempo y qué cantidad de ADN debe ser añadida a los espermatozoides para que la eficiencia en la unión espermatozoide-ADN sea máxima. En los experimentos realizados, el ADN exógeno se une aproximadamente en un 90% a las células espermáticas, y esta unión es seguida de una interiorización nuclear en un 70% de dichas células. Las células espermáticas de epidídimo de ratón incubadas con plásmidos de ADN captan espontáneamente las moléculas exógenas en un periodo de 15-30 min (*Lavitrano et al.* 1989). Para una adecuada optimización del proceso de SMGT, el ADN debe ser añadido a los espermatozoides de cerdo a los 30 min tras el lavado (centrifugado para eliminar el plasma seminal) y no pasados 60 min; de hecho esta es la ventana que coincide con el estadio temprano de capacitación (*Lavitrano et al.* 2003). La interacción entre el ADN y los espermatozoides es completada a las 2-4 h (*Lavitrano et al.* 2003). Es importante optimizar la cantidad de ADN por espermatozoide para obtener el número máximo de espermatozoides que contengan ADN sin sobrecarga. Un

exceso de ADN en los espermatozoides podría dañarlos o ser una desventaja en el momento de la fecundación si los comparamos con espermatozoides normales, y en inseminaciones artificiales esta desventaja podría ser aun mayor (*Figura 7*) (Lavitrano *et al.* 2003).

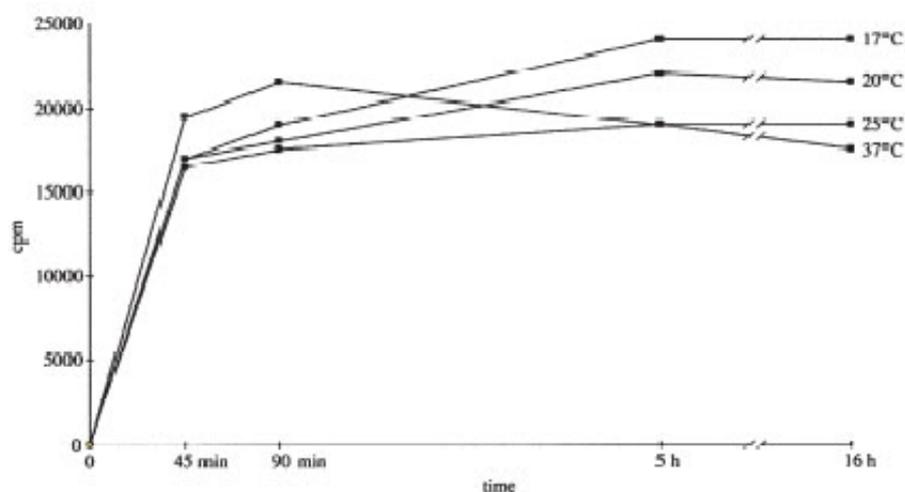
FIGURA 7. Unión del plásmido a espermatozoides de diferentes machos. Se fue incrementando la cantidad de ADN progresivamente a lo largo del tiempo.



Se ha descrito que cada célula espermática de epidídimo de ratón capta entre $1.5-4 \times 10^3$ moléculas de ADN (5 Kpb) en 30 min (Lavitrano *et al.* 1989). Estos valores fueron confirmados en ratón y conejo (Castro *et al.* 1991), mientras que un menor número (10^2) fue detectado en cerdo (Horan *et al.* 1991).

Con la incubación a 17-20°C obtuvieron el mejor compromiso entre ADN captado y la calidad seminal, ya que a esta temperatura se mantiene la viabilidad de los espermatozoides y disminuye la actividad nucleasa (*Figura 8*) (Lavitrano *et al.* 2003).

FIGURA 8. Optimización de la temperatura de incubación ADN/espermatozoide del protocolo de SMT.



Otro factor a tener en consideración es el efecto del plasma seminal. *Lavitrano et al.* (1992) y *Zani et al.* (1995) demostraron que existe un factor inhibidor de la unión con el ADN en el plasma seminal. Pequeñas cantidades de fluido seminal añadido a los espermatozoides lavados impide la unión (*Figura 9 y 10*). Estos experimentos enfatizan la importancia de la eliminación por completo del plasma seminal lo antes posible tras la recogida del eyaculado (*Lavitrano et al.* 2003).

No obstante, los espermatozoides maduros tienen una protección natural para evitar la intrusión de ADN foráneo. El plasma seminal antagoniza con la unión del ADN exógeno, ejerciendo una poderosa protección del espermatozoide. Un factor inhibidor (determinado como IF-1) fue identificado tanto en el plasma seminal como en la superficie del espermatozoide. Para caracterizar esta reacción, se prepararon extractos de IF-1 procedentes de erizo de mar. IF-1 se une selectivamente al segmento postacrosomal del espermatozoide, siendo el mismo lugar donde se une el ADN exógeno. En presencia de los factores inhibidores, las proteínas de superficie que unen al ADN pierden dicha capacidad (*Zani et al.* 1995). En ausencia de IF-1, estas proteínas son capaces de interactuar con el ADN y dichos complejos introducen el ADN en la célula mediante las moléculas CD4 (*Lavitrano et al.* 1997b). Por lo tanto, este factor juega un papel importante actuando como una barrera natural y protegiendo el espermatozoide epididimario de intrusiones de moléculas exógenas que pudieran comprometer la integridad del espermatozoide y la identidad genética de la progenie (*Spadafora* 1998).

Al analizar la tasa de unión de los espermatozoides al ADN, *Castro et al.* (1991) encuentran que solo el 0.3% de los espermatozoides de cerdo unen el ADN, mientras *Camaioni et al.* (1992) obtienen un 78% de unión. Niveles intermedios entre 30% (Horan *et al.* 1991) y 12-17% (Gandolfi *et al.* 1996) se encuentran en la literatura.

FIGURA 9. Autorradiografías de células espermáticas de ratón incubadas con el plásmido radioactivo ^3H (a) y seguidos de la preincubación con cantidades crecientes de extractos de IF-1 de erizo de mar (b) 125 ng (c) 250 ng (d) 300 ng (e) 1 μg . Tinción de Hematoxilina, 1000X (Zani *et al.* 1995).

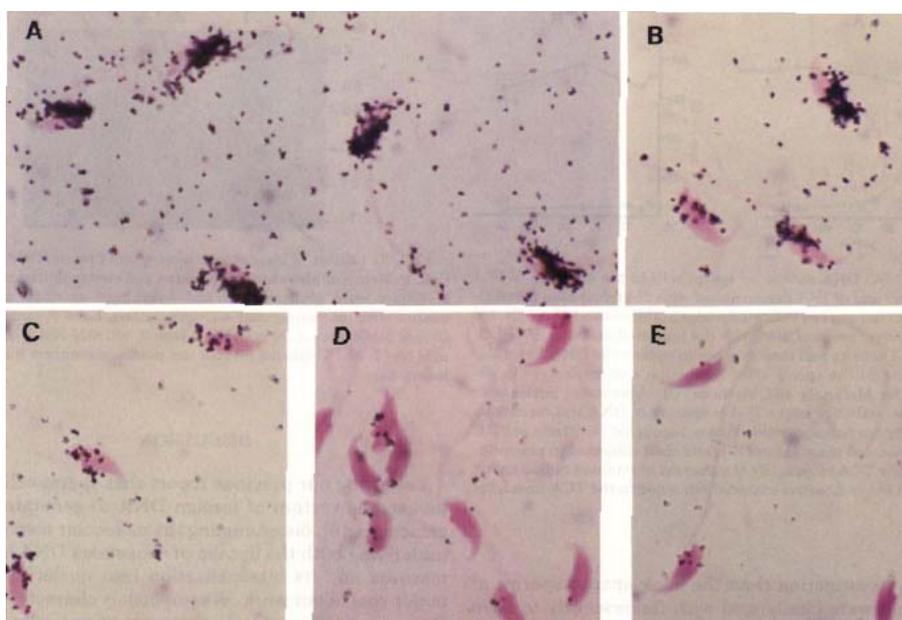
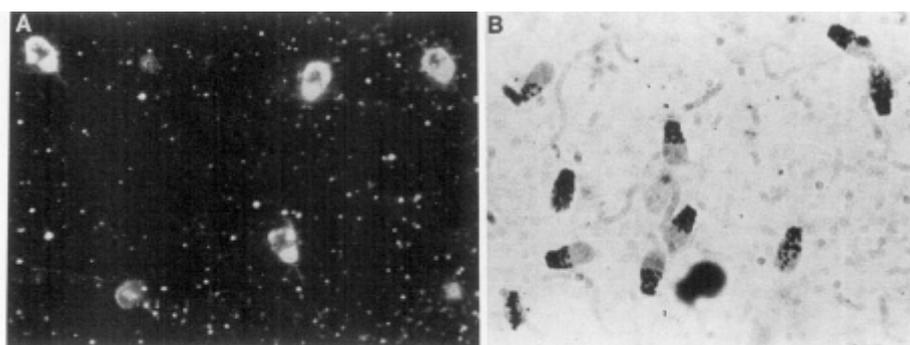


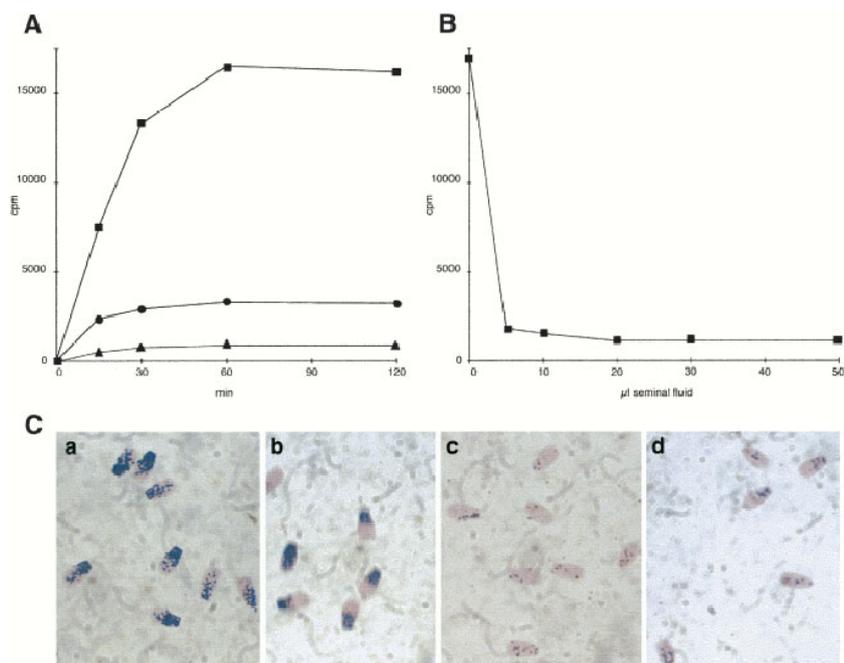
FIGURA 10. Unión de IF-1 fluorescente a células espermáticas de bovino. (a) Unión preferencial de IF-1 al segmento postacrosomal de la cabeza espermática. La imagen (b) muestra que como IF-1, el plásmido radioactivo ^3H , también se une en la misma porción de la cabeza espermática (Zani *et al.* 1995).



La *figura 11A* muestra la captación de ADN por los espermatozoides de verraco y su interiorización en el núcleo a lo largo del tiempo. El grupo de *Lavitrano* (2003) encontró que los espermatozoides no tratados no captan ADN exógeno (*Figura 11A* ▲); La captación de ADN tiene lugar solo cuando existe un exhaustivo lavado de los espermatozoides y una vez que se ha eliminado totalmente el plasma seminal (*Figura 11A* ■). Aproximadamente el 20% del ADN unido al espermatozoide es interiorizado dentro del núcleo espermático (*Figura 11A* ●). En la *figura 11C* tenemos 4 paneles de imágenes autorradiográficas de espermatozoides eyaculados de cerdo después de 2 h de incubación con el plásmido radioactivo RSVhDAF. Dichas imágenes representan:

- *Panel A*: Espermatozoides eyaculados lavados
- *Panel B*: Núcleo de los espermatozoides del *panel A*
- *Panel C*: Espermatozoides eyaculados no lavados
- *Panel D*: Espermatozoides eyaculados lavados preincubados con 20 μ l de plasma seminal

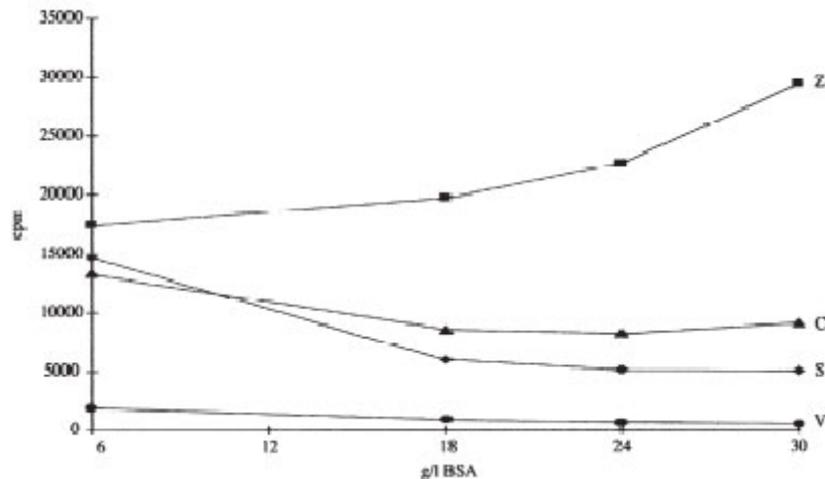
FIGURA 11. Unión del ADN en espermatozoides de cerdo eyaculados. (a) Cinética de unión e interiorización en el núcleo espermático del ADN exógeno en los espermatozoides de verraco. (b) Inhibición de la interacción por la presencia de plasma seminal. (c) Imágenes autorradiográficas de espermatozoides de cerdo sometidos a distintos tratamientos e incubados con el plásmido RSVhDAF.



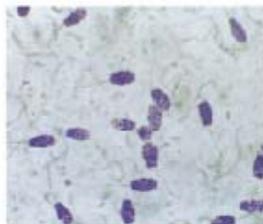
Lavitrano et al. (2002) desarrollaron un medio libre de calcio en el cual el proceso de capacitación se producía lentamente en ausencia del plasma seminal. El uso de este medio libre de calcio es muy importante porque la presencia de calcio en el medio aumenta la probabilidad que endonucleasas endógenas actúen sobre el ADN exógeno. Para permitir la capacitación en ausencia del plasma seminal y de calcio, se varió la temperatura y la cantidad de BSA añadida al medio, dos factores que pueden modular el tiempo de capacitación. Realizaron experimentos donde optimizaron el proceso en ausencia de calcio en el medio. Para ello usaron diferentes concentraciones de BSA (desde 6 a 30 g/l), para determinar las mejores condiciones de incubación del ADN con los espermatozoides (*Lavitrano et al.* 2003).

FIGURA 12. Unión ADN-espermatozoide en diferentes machos, incrementando la cantidad de BSA utilizada en el medio libre de calcio.

A



B



En la *figura 12A* observamos la unión de espermatozoides de distintos machos (Z, C, S, V) utilizando diferentes cantidades de BSA que se añadieron al medio libre de calcio. Los machos S y C dieron sus mejores resultados cuando

fueron incubados con 6 g/l de BSA, mientras el macho Z tiene su mejor resultado cuando se incuba con 30 g/l BSA. Sin embargo, se observó en las autorradiografías realizadas, que los espermatozoides del macho Z tenían un exceso de ADN (*Figura 12B*), siendo su patrón de localización diferente al de los otros machos. Por ello se utiliza 6 g/l (Lavitrano *et al.* 2003).

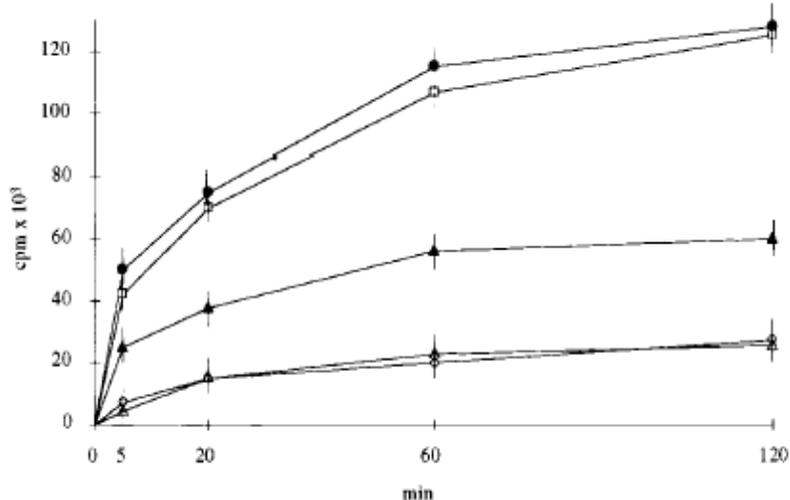
El daño mecánico de la membrana plasmática ocurrido durante el periodo de centrifugación, podría en un principio favorecer la penetración del ADN exógeno en la cabeza espermática, sin embargo el grupo de Lavitrano (Francolini *et al.* 1993) descarta esta posibilidad, realizando diversos experimentos donde llegaron a las siguientes conclusiones: (1) Espermatozoides con una alta motilidad y viabilidad espermática tienen mayor capacidad de captar ADN exógeno; (2) Las células espermáticas fijadas con glutaraldehído no son capaces de captar ADN foráneo; (3) Espermatozoides centrifugados a 4000 rpm y fijados con glutaraldehído no captan ADN exógeno; (4) Espermatozoides fijados con glutaraldehído después de la incubación con el ADN muestran el mismo patrón de unión que las células espermáticas no fijadas.

1.5.2.2 Mecanismo molecular de interacción ADN-espermatozoide

Diversos estudios corroboraron que las moléculas de ADN se unen a la cabeza espermática en la región postacrosomal en las proximidades del área ecuatorial (Lavitrano *et al.* 1992; Spadafora 1998). Una vez unidas a la membrana celular, las moléculas de ADN son capturadas (Francolini *et al.* 1993). El proceso de unión de ADN e interiorización no es un evento al azar sino una interacción iónica, reversible e independiente de la secuencia y no restringida al ADN pudiendo ser reproducida usando otras macromoléculas cargadas negativamente (Spadafora 1998). El ADN exógeno interactúa con proteínas de 30-35 KDa, las cuales están presentes en la superficie de las células espermáticas (Lavitrano *et al.* 1992; Zani *et al.* 1995) jugando un papel trascendental en la interacción ADN-espermatozoide tanto el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) como las moléculas CD4 (Lavitrano *et al.* 1997b) (*Figura 15*). De hecho células espermáticas de ratones *knockout* para MHC II tienen una reducida habilidad para unir ADN exógeno comparado con espermatozoides procedentes de animales control (Mori *et al.* 1990; Wu *et al.* 1990). La captura de ADN por las células espermáticas procedentes de ratones

knockout para MHC II fue un 50% menor en comparación con espermatozoides procedentes de animales normales (Figura 13).

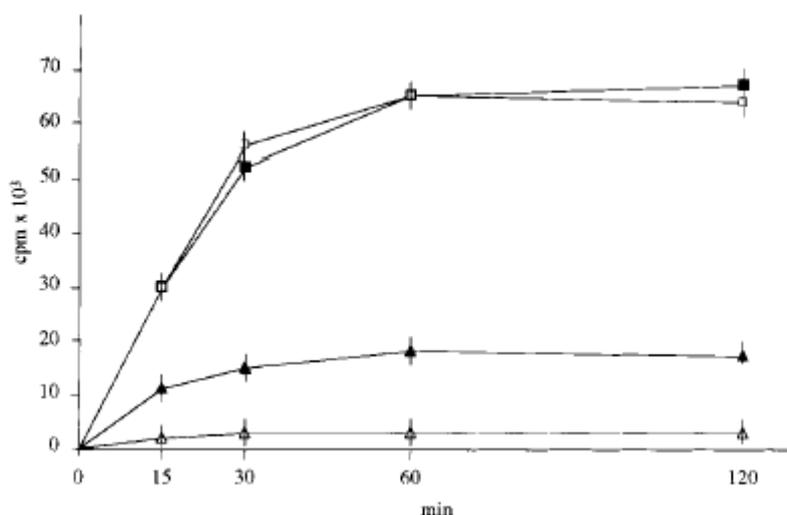
FIGURA 13. Unión e interiorización del ADN exógeno en células espermáticas procedentes de ratones *knockout* para el complejo MHC II. La gráfica muestra a lo largo del tiempo la asociación del ADN exógeno con las células espermáticas de ratones normales (●), y *knockout* MHC tipo II (▲), y procedentes de crías *knockout* MHC II (□), y la asociación con el núcleo espermático de ratones normales (○) y de ratones *Knockout* MHC II (Lavitrano *et al.* 1997b).



Espermatozoides de ratones *knockout* para CD4 son totalmente capaces de unir ADN pero no de interiorizarlo en la célula. Para demostrar el papel que tienen las moléculas CD4, el grupo de *Lavitrano* demostró que incubando anticuerpos monoclonales anti-CD4 con espermatozoides no maduros se evita la interiorización del ADN en la célula. El MHC II es requerido durante la espermatogénesis para producir células espermáticas capaces de capturar ADN exógeno, mientras que las moléculas CD4 presentes en las células espermáticas median en la internalización del ADN unido al espermatozoide (Lavitrano *et al.* 1997b).

La figura 14 muestra que tanto los espermatozoides de ratón *knockout* para CD4 como los normales tienen la misma capacidad para unir ADN. Sin embargo, la internalización de ADN se encuentra en los espermatozoides normales pero no en el núcleo espermático de ratones *knockout* para CD4. La falta de expresión de CD4 inhibe la habilidad de las células espermáticas de interiorizar el ADN exógeno dentro del núcleo.

FIGURA 14. Unión e interiorización de ADN exógeno en células espermáticas de ratones *knockout* para CD4. La gráfica muestra la asociación a lo largo del tiempo del ADN con los espermatozoides procedentes de ratones normales (■), y *knockout* para CD4 (□), y con el núcleo espermático de ratones normales (▲), y *knockout* para CD4 (△) (Lavitrano *et al.* 1997b).



La unión del ADN se realiza de manera específica en la matriz nuclear (Zoraqi & Spadafora 1997; Magnano *et al.* 1998; McCarthy & Ward 2000), zona que coincide con la región del segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.

Una evidencia que muestra que las moléculas exógenas pueden penetrar dentro de cabezas espermáticas fue obtenida incubando espermatozoides de epidídimo con DNasa I. El ADN genómico extraído de espermatozoides de ratón incubados con cantidades crecientes de DNasa I, es considerablemente degradado si lo comparamos con el ADN extraído de muestras de la misma suspensión espermática que no fue expuesta a la acción de la nucleasa. Este trabajo demuestra que el 70% de las células están protegidas de la degradación enzimática debida posiblemente a que la mayoría de las moléculas de ADN se encuentran dentro o fuertemente unidas a las cabezas espermáticas (Lavitrano *et al.* 1991).

Una de las preguntas que se planteó el grupo de Lavitrano fue el de dilucidar si el ADN exógeno era absorbido por el espermatozoide a través de un proceso pasivo o mediante un mecanismo específico. Demostraron que las

células espermáticas captaban más eficientemente ADN de mayor tamaño (7 Kpb) que si eran menores (150-750 bp) (Lavitrano *et al.* 1992). Estas observaciones descartaron la posibilidad de que las moléculas de ADN fueran pasivamente interiorizadas, sugiriendo que el proceso que se llevaba a cabo eran interacciones iónicas, si es así, la densidad de carga de las moléculas resulta en la unión de grandes moléculas en preferencia a las pequeñas. Esta evidencia confirma que las cargas de las moléculas juegan un rol importante en la asociación con las células espermáticas (Lavitrano *et al.* 1992). En particular observaron que no solo los ácidos nucleicos sino también otros poli-aniones, como la heparina y el dextranosulfato, así como proteínas de bajo punto isoeléctrico, se unen eficientemente a las células espermáticas.

1.5.2.3 Organización e integración del ADN exógeno interiorizado en el núcleo espermático

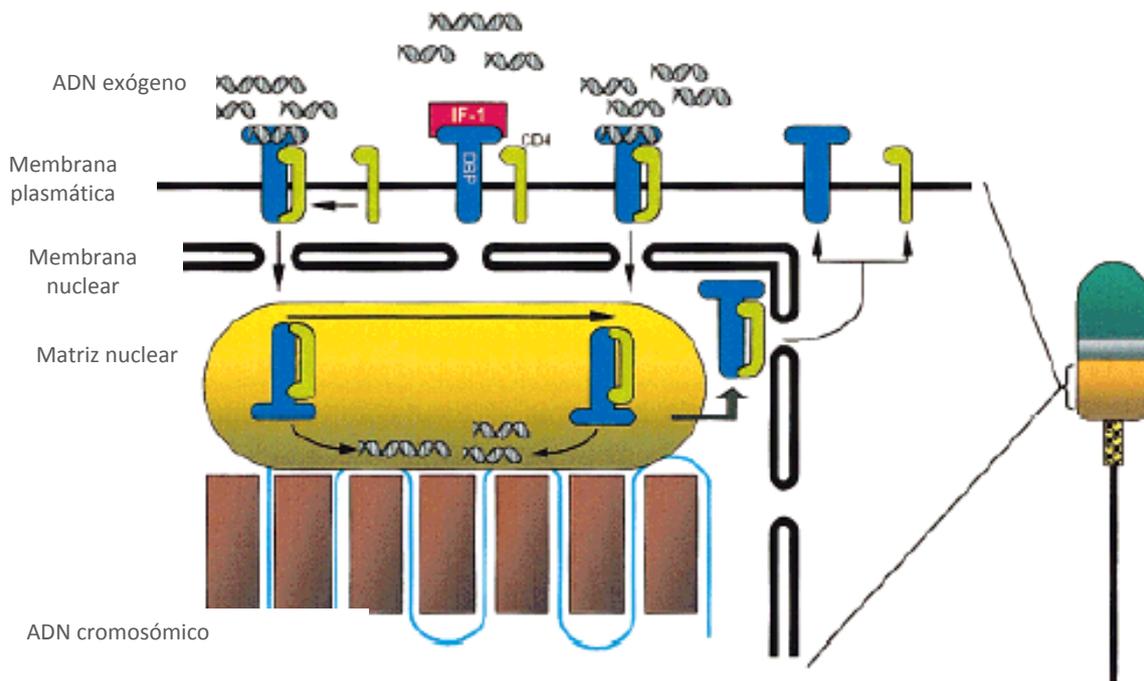
Tras la interacción ADN-espermatozoide y la interiorización, el siguiente paso conlleva la integración del ADN dentro del genoma. Varios mecanismos han sido descritos para la integración del ADN en el proceso de microinyección (Brinster *et al.* 1985; Coffin 1990). Algunos grupos han sugerido que el evento de la integración podría resultar de la activación de un mecanismo enzimático endógeno, como el que ocurre durante la reparación del ADN (Spadafora 1998). Estos datos indican que el proceso se lleva a cabo tras la penetración del espermatozoide en el ovocito pero no es conocido que ocurra con la integración del ADN antes de la fecundación. Usando la técnica de SMGT las secuencias de ADN exógeno se unen fuertemente al núcleo espermático y la integración del ADN exógeno ocurre preferentemente intercalándose con elementos nucleares tipo I. La presencia de la secuencia de la topoisomerasa II al principio y al final de la secuencia de integración del gen, sugiere un posible rol de esta enzima en el proceso de integración (Spadafora 1998). *Magnano* en 1998, demostró que las secuencias exógenas del plásmido pSV2CAT fueron integradas en un único lugar en el genoma espermático.

Se observó que la proporción de ADN interiorizado en el núcleo representaba constantemente entre un 15-22% del total de los espermatozoides unidos. Esto sugirió que este hecho no era consecuencia de un proceso pasivo y sin control, sino de un mecanismo regulado. Autorradiografías estructurales de espermatozoides de epidídimo y eyaculado de toro lavados, e incubados con ADN

marcado radioactivamente (^3H) muestran que el transgén es interiorizado y ensamblado en la cromatina espermática (Francolini *et al.* 1993).

En la *figura 15* queda representado el proceso de interiorización de las moléculas de ADN exógenas en el núcleo espermático propuesto por Spadafora 1998. El ADN foráneo se une a unas proteínas situadas en la superficie de la membrana espermática (DPBs: DNA binding proteins, color azul), desprovistas del factor inhibidor (IF-1, rojo). La unión de las moléculas de ADN activa el mecanismo de interiorización, representado por la asociación de las moléculas CD4 (verde) con el complejo ADN/DPB. El complejo ADN/DPB/CD4 penetra en el núcleo y se disocia a nivel de la matriz nuclear (amarilla), dejando el transgén en contacto cercano con el ADN cromosómico del espermatozoide (azul claro). El complejo proteico DPB/CD4 es reciclado hacia la superficie espermática (Spadafora 1998).

FIGURA 15. Proceso de interiorización de las moléculas de ADN exógenas en el núcleo espermático (Spadafora 1998).



La interiorización activa de una proporción considerable del ADN exógeno unido al espermatozoide hizo plantear la cuestión de que la organización original de las moléculas de ADN, era modificada durante el transporte a través de la

célula al interior del núcleo. Para resolver dicha cuestión se realizaron *Southern Blot* de células espermáticas de ratón incubadas con el plásmido β -Lactoglobulina de oveja. Encontraron que las moléculas del plásmido permanecían intactas cuando los espermatozoides eran incubados con dosis bajas de ADN (1-10 ng/10⁶ espermatozoides), en contraste, el ADN era altamente degradado cuando eran usadas altas cantidades de ADN en la incubación (100-500 ng/10⁶ espermatozoides). Estos resultados demuestran que los espermatozoides de epidídimo reaccionan a la presencia masiva de ADN exógeno mediante una actividad nucleasa causando su degradación. La actividad de las nucleasas endógenas de los espermatozoides es calcio-dependiente. Cuando las nucleasas son activadas por la presencia del ADN exógeno, éstas catalizan la degradación localizada del ADN cromosómico del espermatozoide. La degradación del ADN y la modulación de la actividad de las nucleasas nos recuerdan la apoptosis asociada al ADN descrita en las células somáticas (Spadafora 1998).

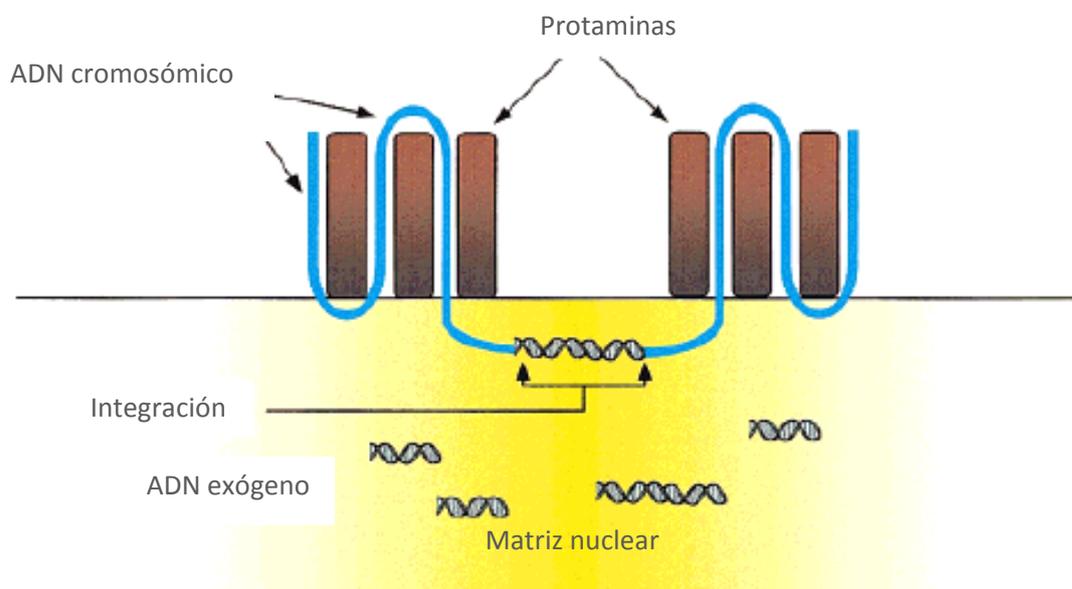
Estos descubrimientos explican, en parte, las diferencias existentes en la repetitividad de la SMGT en las diferentes especies, y da lugar a una probable explicación de la dificultad de la obtención de animales transgénicos usando células espermáticas de epidídimo como vectores del transgén. A diferencia de trabajar con otras especies donde se han utilizado espermatozoides eyaculados; en espermatozoides de epidídimo, debido a la activación de las nucleasas (pero no en eyaculado) los espermatozoides degradaran gravemente el ADN exógeno (por dichas enzimas), eliminando las células cargadas con el ADN foráneo (Spadafora 1998).

Se ha demostrado que el ADN exógeno se interioriza en el núcleo de los espermatozoides de ratón y estas secuencias se encuentran fuertemente unidas a la estructura nuclear espermática (Zoraqi & Spadafora 1997; Magnano *et al.* 1998). Zoraqi & Spadafora (1997) realizaron una experiencia donde se extrajo el genoma de células espermáticas incubadas con el plásmido pSV2CAT, mediante un análisis de *Southern Blot* observaron que las secuencias de los plásmidos se habían recombinado con el ADN cromosómico de espermatozoides de ratón. Se seleccionaron dos clones al azar que fueron secuenciados; en ambos casos el sitio de integración en el genoma fue idéntico y la secuencia de la topoisomerasa II coincidía con el final de la integración de los plásmidos, lo que sugiere un posible rol de esta enzima en el proceso de recombinación no homologa. Una posible explicación del lugar de integración sería la hipótesis de que la estructura cromatínica alterada asume el sitio específico en el núcleo espermático. En la

figura 16 podemos observar gráficamente el mecanismo de integración del ADN exógeno en el núcleo espermático (Spadafora 1998).

Los mecanismos que gobiernan la integración durante la SMGT no se conocen con exactitud. Se ha propuesto que los sitios potenciales de la integración del ADN foráneo son los sitios de cromatina que están interpuestos con elementos nucleares de gran longitud (Pittoggi *et al.* 1999).

FIGURA 16. Mecanismo de integración del ADN exógeno en el ADN cromosómico del espermatozoide: la integración ocurre en las regiones del ADN cromosómico (azul) que se sitúan adyacentes a las protaminas (marrón) (Spadafora 1998).



1.5.3 LOCALIZACIÓN DEL ADN EXÓGENO EN EL ESPERMATOZOIDE. MÉTODOS DE EVALUACIÓN

Cada célula espermática es capaz de unir un número variable de ADN exógeno y cada molécula encuentra su propio acceso a través de la membrana plasmática. La membrana plasmática correspondiente al segmento postacrosomal de la cabeza es la zona más permisiva a la hora de captar ADN exógeno. Esta región particular de la membrana está bioquímicamente bien diferenciada por ser la región delimitada por el acrosoma (Bedford & Cooper

1978; Meizel 1984). Además sabemos que la membrana plasmática de la región posterior de la cabeza espermática está involucrada en la fusión de los gametos durante el final del proceso de fecundación (Bedford *et al.* 1979; Shalgi & Phillips 1980; Yanagimachi 1981). *Atkinson*, en 1991, describe en bovino, ovino e insectos, cuatro sitios diferentes de interacción del ADN exógeno con las células espermáticas: (I) acrosoma, (II) región ecuatorial (III), región subecuatorial (IV) y parte final de la cabeza, pero la mayor parte de la interacción ocurre en la región III.

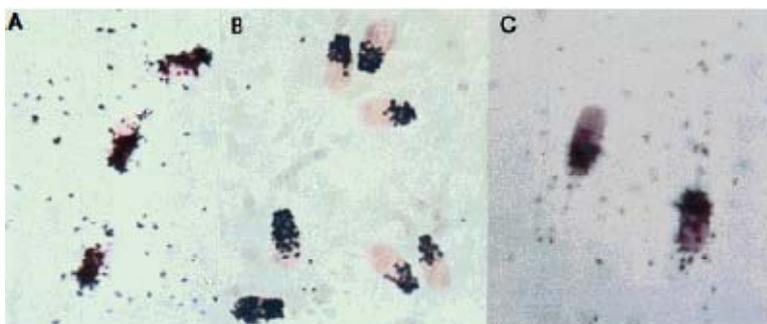
En 1991 las primeras evidencias del lugar de unión se realizaron mediante **análisis autorradiográficos** (métodos de visualización con el uso de radioisótopos) donde se muestra que la unión de las células espermáticas y el ADN están localizados preferentemente en la mitad posterior de la cabeza espermática correspondiente al área nuclear (Lavitrano *et al.* 1991, 1992). Pero esta distribución no ocurre solo en ratón sino en otras especies como bovino (Francolini *et al.* 1993). El mismo patrón es observado en espermatozoides de cerdo, pero parte de ese ADN también se distribuye en otros lugares de la cabeza, además de la cola. *Lavitrano* ha demostrado que existen dos distribuciones preferenciales en la célula espermática: alrededor del 80% se localiza en la periferia del núcleo entre la membrana plasmática y nuclear, mientras que el restante 20% es claramente interiorizado en el núcleo. Ambas distribuciones pueden coexistir en la misma célula espermática. Para tener constancia de la interiorización del ADN exógeno en el núcleo espermático es necesario realizar un análisis autorradiográfico bajo el microscopio electrónico (Zani *et al.* 1995).

Francolini et al. (1993) realizan autorradiografías de espermatozoides que han sido incubados con ADN para conocer si la unión al ADN se realiza en el núcleo. Las células espermáticas fueron incubadas durante diferentes periodos de tiempo con ADN (pSV2CAT, 5 Kpb) marcado con moléculas radioactivas (^3H). Demostraron que una parte considerable del ADN interactúa con la célula espermática y una parte de éste, es rápidamente asociado con el núcleo. El porcentaje de ADN exógeno que se asocia con el núcleo se encuentra entre el 6 y el 29% del total de la unión al espermatozoide.

Sperandio et al. (1996) realizaron una comparación de unión entre espermatozoides de epidídimo de ratón con espermatozoides eyaculados de cerdo y toro, mostrando que las células espermáticas de cerdo y toro (entre 50-80% de los espermatozoides unen ADN exógeno) tienen menor capacidad de

unión que los espermatozoides epididimarios de ratón (alrededor de un 90%), esto puede ser debido al efecto inhibitor que presentan los restos de plasma seminal. En las tres especies el ADN se une en la región postacrosomal. En la *figura 17* queda representada una imagen de espermatozoides unidos al transgén en las 3 especies (ratón, bovino, cerdo).

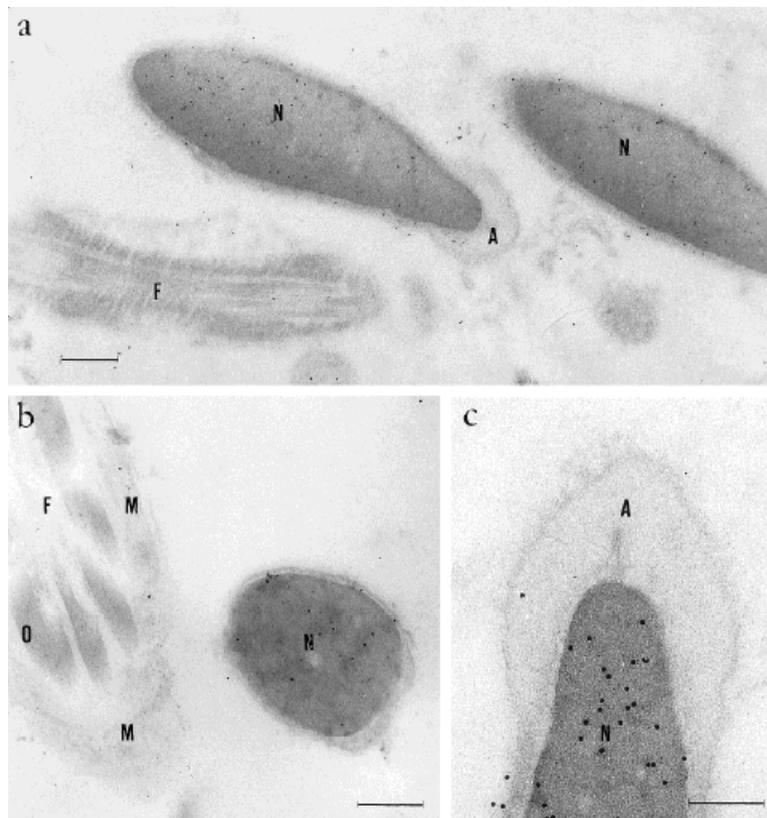
FIGURA 17. Autorradiografías de espermatozoides epididimarios de ratón (a) y espermatozoides eyaculados y lavados de bovino (b) y de cerdo (c) asociados con el plásmido pSV2CAT marcado con ^3H (Spadafora 1998).

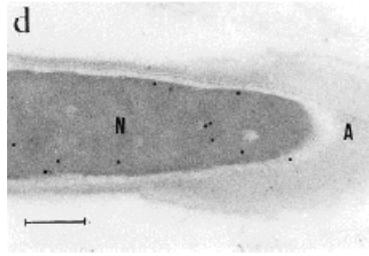


Otros estudios, como los que a continuación se describen, utilizan como herramienta de localización del ADN en el espermatozoide la **microscopía electrónica**. El microscopio electrónico utiliza electrones en vez de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales (hasta 500.000 aumentos comparados con los 1000 aumentos de los mejores microscopios ópticos) debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones. *Francolini et al.* (1993) realizaron análisis cualitativos revelando que los espermatozoides de epidídimo de ratón y espermatozoides lavados de toro unen moléculas de ADN exógeno. El ADN aparece localizado en la cabeza espermática, en secciones longitudinales del espermatozoide el ADN se concentra en la cabeza del espermatozoide en correspondencia con la parte posterior del área del núcleo. No encontraron cantidades significativas de ADN en la región acrosomal y en la cola, y sí en algunas ocasiones, en la región mitocondrial de la pieza intermedia. La distribución en cortes longitudinales y trasversales de espermatozoides de ratón y toro muestran dos patrones diferentes de distribución: una primera distribución en la periferia del núcleo y una segunda dentro del núcleo, demostrando la

interiorización del núcleo. Estos dos tipos de distribución pueden encontrarse en la misma célula. *Huguet & Esponda* (1998) realizaron un estudio en rata y ratón donde introducen ADN exógeno directamente en los vasos deferentes. El microscopio electrónico reveló que numerosos gránulos de oro aparecían sobre todo en el núcleo espermático, y también asociados a la membrana plasmática y a la matriz acrosomal. Otras estructuras espermáticas como mitocondrias, axonema o estructuras relacionadas con el axonema estaban normalmente desprovistas de gránulos. La cuantificación de estos gránulos mediante análisis de imágenes computerizado determinó una distribución del 34% en el núcleo espermático, 7.5% en otras estructuras espermáticas y 9% en el *background* (Ver figura 18).

FIGURA 18. Las imágenes (a-c) corresponden a imágenes de microscopía electrónica de espermatozoides de ratón que fueron recogidos tras la inyección de ADN exógeno en los vasos deferentes. La mayor parte de los gránulos de oro aparecen en el núcleo (N). Algunos gránulos también se observan en el acrosoma (A) o en la superficie espermática. El flagelo (F) y mitocondria (M) están desprovistos de gránulos de oro. La imagen (d) muestra espermatozoides tratados con DNasa I donde se observa la presencia de numerosos gránulos en el núcleo (Huguet & Esponda 1998).





Otra herramienta utilizada ha sido el **microscopio de fluorescencia** ya sea mediante inmunofluorescencia (Lavitrano *et al.* 1997b) o por incubación directa de los espermatozoides con ADN exógeno marcado con algún fluorocromo (Anzar & Buhr 2006; Carballada & Esponda 2001). La inmunofluorescencia se utilizó (Lavitrano *et al.* 1997) incubando espermatozoides epididimarios de ratón con anticuerpos monoclonales (unidos a un marcador fluorescente) anti-CD4 (responsables de la interiorización del ADN exógeno en el núcleo) demostrando que las moléculas CD4 se localizan en el segmento postacrosomal de las células espermáticas (Figura 19).

FIGURA 19. Imagen de espermatozoides de ratón incubados con anticuerpos anti-CD4 marcados con fluorescencia (Lavitrano *et al.* 1997b).



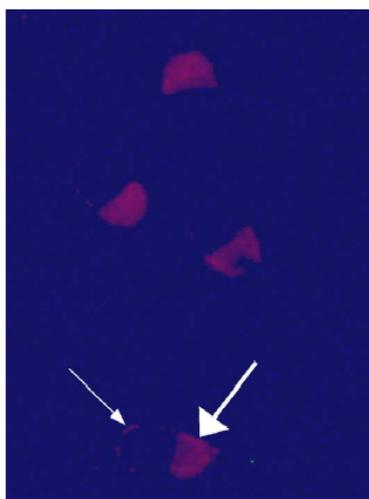
Posteriormente, *Gandolfi et al.* (1996) mediante inmunolocalización, muestran que las moléculas de ADN se encontraban asociadas a los espermatozoides entre un 12-17% dependiendo del tratamiento espermático.

Mientras que *Anzar & Buhr* (2006) utilizan dos tipos de plásmidos marcados con dos fluorocromos diferentes: Rodamina-GFP y FITC-CAT

(Cloramfenicol acetil transferasa) ambos con un tamaño de 5.7 Kpb. Los experimentos se realizaron con semen fresco y congelado de toro. Los espermatozoides se visualizaron mediante el microscopio de fluorescencia, y se clasificaron como transferidos si tenían coloración roja o verde (dependiendo del fluorocromo unido al plásmido) en la región postacrosomal.

Los resultados mostraron que la señal fluorescente se encontraba principalmente en la cabeza del espermatozoide, sobre todo en la región postacrosomal. Se encontraron dos tipos de patrones, unas pequeñas gotas en la región apical del acrosoma y una banda uniforme en la región postacrosomal (*Figura 20*).

FIGURA 20. Espermatozoides con el ADN unido (fluorescencia roja) a la región postacrosomal y la zona apical (Anzar & Buhr 2006).



En este estudio se observaron dos poblaciones: 1) Rojo fluorescente en región postacrosomal con filtro de rodamina y fluorescencia verde bajo filtro FITC (vivos y transfectados); 2) Ausencia de fluorescencia bajo filtro de rodamina y fluorescencia verde bajo filtro FITC (espermatozoides vivos pero no transfectados). Los espermatozoides con fluorescencia únicamente roja (transfectados y muertos) no fueron observados, indicando que el ADN exógeno se une solo con espermatozoides vivos. Ni el macho utilizado ni los plásmidos afectó a la unión. Se muestra una mayor unión cuando se usa semen congelado que fresco (49% vs. 29%).

El **microscopio confocal** es otra de las herramientas utilizadas para visualizar la unión espermatozoide-transgén. Se trata de un microscopio capaz de obtener imágenes tridimensionales de la célula, basándose en un principio similar al del microscopio de fluorescencia. Se utiliza un láser como fuente luminosa, y con él se va barriendo la muestra por todo su volumen, plano a plano, creando numerosas imágenes bidimensionales que un ordenador interpreta, generando finalmente una imagen tridimensional de la célula. *Chan et al.* (2000a, 2000b) utilizaron esta técnica para detectar la unión del ADN exógeno en espermatozoides de mono "Rhesus" tras ser inyectados en ovocitos mediante ICSI, encontrando dicho ADN principalmente en la superficie de los espermatozoides, también lo han utilizado en otras especies como bovino y roedores. *Huguet & Esponda* (1998) muestran mediante esta técnica que la mayor parte del transgén aparecía en el área del núcleo y también a nivel intranuclear. Además algunos puntos fluorescentes aparecieron en otras regiones del espermatozoide o asociados con la membrana plasmática (*Figura 21*).

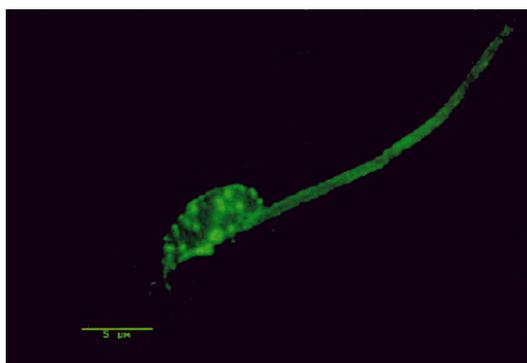


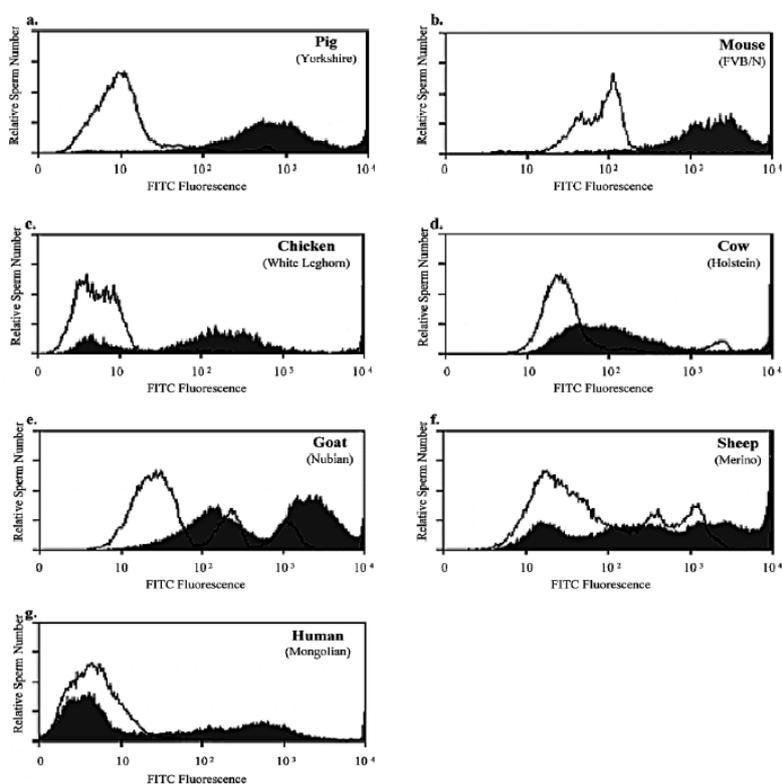
FIGURA 21. Imagen de microscopio confocal de espermatozoides de ratón. Numerosos puntos fluorescentes se visualizan en el núcleo espermático, así como otros en la periferia del gameto (*Huguet & Esponda 1998*).

Huguet & Esponda (1998) introducen ADN directamente en los vasos deferentes de rata y ratón, realizando dos pruebas: *in vitro* (coincubación) e *in vivo* (directamente en vasos deferentes). Los resultados obtenidos, utilizando microscopía confocal y de fluorescencia, son similares tanto en la prueba *in vitro* como *in vivo*. En ratón, obtienen *in vivo* un 78% e *in vitro* un 69%. En la rata, los valores fueron 60% (*in vivo*) y 70% (*in vitro*). En la mayoría de los casos, los espermatozoides con el ADN unido mostraron un patrón muy similar de fluorescencia, caracterizado por numerosos puntos fluorescentes en la cabeza espermática.

La **citometría de flujo** es una técnica destinada a la cuantificación de componentes o características estructurales de las células que implica medir las

características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. A pesar de que las mediciones son realizadas sobre células individuales y por unidad de tiempo, permite procesar miles de células en pocos segundos. *Chang et al.* (2002) utilizan el citómetro de flujo para comparar la unión que se produce entre ADN y espermatozoides en diferentes especies (cerdo, ratón, pollo, toro, caprino, ovino y humano). Para ello, utilizan un anticuerpo monoclonal con señal fluorescente que se une a la superficie celular, comprobando que en todas las especies estudiadas se producía unión en mayor o menor grado (*Figura 22*).

FIGURA 22. Imágenes de citometría de flujo donde se muestra la unión entre espermatozoides de diferentes especies (cerdo, ratón, pollo, toro, cabra, oveja y humano) con el transgén. Las imágenes bajo la línea corresponden a controles negativos de los análisis espermáticos. Las áreas sombreadas representan los anticuerpos unidos a las células espermáticas de diferentes especies (*Chang et al.* 2002).



El **recuento por centelleo** es una técnica analítica por la cual la energía radioactiva es convertida a luz visible y medida en un líquido orgánico. La cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de radiación presente en

la muestra. Para hacer esto, se coloca la muestra radiactiva con el líquido de centelleo. Este líquido contiene flúor, o un compuesto que despiden luz fluorescente cuando se bombardea con radioactividad, de este modo convierte la radioactividad invisible en luz visible. Un contador líquido de centelleo es un instrumento que detecta la luz como resultado de las emisiones radioactivas que excitan el flúor. El instrumento cuenta estas explosiones de la luz, o de los centelleos, y los registra como cuentas por minuto (CPM). *Chang et al.* (2002), para demostrar la habilidad de los espermatozoides de unirse específicamente con el ADN mediante anticuerpos mAbC, incubó espermatozoides de cerdo, ratón, pollo, caprino, ovino y humano con anticuerpos control y anticuerpos mAbC, utilizando ADN radioactivo (^{32}P) y medidos mediante recuento por centelleo. Con la presencia de mAbC todas las especies estudiadas unen un 25-56% más ^{32}P -ADN en comparación con reacciones control sin anticuerpos o con otro tipo de anticuerpo. Además, observaron que los espermatozoides de pollo son los que menos ADN unían, aunque este hecho no es inesperado ya que el tamaño de los espermatozoides de pollo es 3 veces menor que el de espermatozoides de otros mamíferos.

Lavitrano et al. (2003) hacen una selección de verracos donantes, para ello, se determina la captación del ADN unido a las células espermáticas mediante el recuento por centelleo de las células espermáticas resuspendidas en una concentración de 5×10^6 espermatozoides/ml en SFM/BSA, mezclado con 2 $\mu\text{g/ml}$ de ^3H RSVhDAF plásmido, e incubado a 17°C . También se llevaron a cabo experimentos autorradiográficos para verificar que el ADN exógeno estaba siendo captado por la mayoría de los espermatozoides y el núcleo, y que el ADN está correctamente localizado en las células espermáticas y núcleo.

Estos mismos autores, al incubar espermatozoides intactos de ratón con ADN exógeno marcado con fluorocromo no encontraron ninguna señal de fluorescencia, sin embargo espermatozoides de la misma muestra tras la sonicación presentan cierta fluorescencia en la región postacrosomal (*Figura 23*). Cuando estos espermatozoides se observaron en el microscopio electrónico, la mayoría de las cabezas habían perdido el acrosoma y la mayoría de las membranas se encontraban alteradas. Esto indica que no es el acrosoma el que previene la unión al ADN en regiones anteriores de la cabeza (Carballada & Esponda 2001).



FIGURA 23. (a) Espermatozoides intactos no presentan señal de fluorescencia, por lo que no unen ADN. (b) Espermatozoides de la misma muestra tras la sonicación muestran cierta fluorescencia en la región postacrosomal de la cabeza (Carballada & Esponda 2001).

Existe cierta controversia respecto al hecho de que sean los espermatozoides muertos o con alteración de sus membranas los que se unen al ADN. Así pues, según algunos autores los espermatozoides muertos de ratón (Lavitano *et al.* 1989), de cerdo (Horan *et al.* 1991) y humanos (Camaioni *et al.* 1992) no tienen capacidad de unirse al ADN. Sin embargo, Perry *et al.* (1999), utilizan espermatozoides muertos, debido al tratamiento de permeabilización que realizan (Tritón X-100, congelación rápida, congelación-secado), y demuestran que dichas células al incubarlas con la GFP e inyectarlas mediante ICSI, son capaces de fecundar y dar lugar a embriones transgénicos. Posteriormente, se han publicado un gran número de trabajos que han confirmado el uso de espermatozoides con membranas alteradas (Shim *et al.* 2000; Lee *et al.* 2003; Moreira *et al.* 2004).

1.5.4 PRODUCCIÓN DE “ESPERMATOZOIDES TRANSGÉNICOS” EN DIFERENTES ESPECIES

La célula espermática, aunque bien estudiada en muchos aspectos, nunca había sido considerada como un sistema de transporte de ADN exógeno. Algunas buenas razones justifican este hecho: los espermatozoides son haploides, tienen un citoplasma compacto y muy reducido, y han perdido la mayoría de las funciones moleculares y bioquímicas características de las células somáticas (Spadafora 1998).

A mitad de los años setenta, Spadafora & Geraci (1975) mientras estudiaban la organización nucleosomal de la cromatina espermática de erizo de mar con nucleasas de micrococos, se dieron cuenta de que la degradación de la cromatina podía desencadenarse simplemente añadiendo enzimas de micrococos a espermatozoides intactos. Estas simples observaciones sugirieron que existía

un acceso al interior de los espermatozoides de las enzimas, a través de sus membranas. Posteriormente, se vio que no solo las proteínas tenían acceso sino también moléculas de ADN, pudiendo utilizar a los espermatozoides como vectores de material genético exógeno. Pero realmente fue en 1971 cuando *Brackett et al.* mostraron que los espermatozoides de conejo libres de plasma seminal eran capaces de captar y transferir el transgén SV40 a ovocitos durante la fecundación. Este hecho quedó en el olvido hasta 1989 cuando *Lavitrano et al.* publican un artículo revolucionario donde crean ratones transgénicos a partir de

ovocitos fecundados con células espermáticas incubadas con ADN exógeno. El establecimiento del protocolo de SMGT podría ser aplicado a diferentes especies siendo de un valor extraordinario en biotecnología.

Numerosos trabajos muestran que las células espermáticas de prácticamente todas las especies son capaces de capturar ADN exógeno (*Tabla 1 y 2*). Se han publicado resultados negativos al respecto (*Brinster et al. 1989*), pero una gran mayoría han sido exitosos como ha ocurrido en: **erizo de mar** (*Arezzo 1989*), **abeja** (*Milne et al. 1989; Robinson et al. 2000*), **rata** (*De la Fuente et al. 1990; Yonezawa et al. 2001, 2002*), **insectos** (*Atkinson et al. 1991*), **peces** (*Castro et al. 1991; Khoo*

TABLA 2 Interacción entre espermatozoides y ADN exógeno en varias especies (Spadafora 1998).

Clase	Especies	Método transformación espermática
Equinoideos	Erizo mar	Incubación ADN/spz
Moluscos	Abalone	Electroporación
Insectos	Mosquito	Incubación ADN/spz
	Abeja	Incubación ADN/spz
Peces	Carpa	Incubación ADN/spz
	Carpa	Electroporación
	Pez galo	Electroporación
	Tilapia	Electroporación
	Pez cebra	Electroporación
	Salmón	Electroporación
Anfibios	<i>X. Laevis</i>	Incubación ADN/spz
Pájaros	Gallo	Incubación ADN/spz
	Gallo	Liposomas
	Gallo	Electroporación
Mamíferos	Ratón	Incubación ADN/spz
	Ratón	Incubación ADN/spz
	Ratón	Liposomas
	Carnero	Incubación ADN/spz
	Macho cabrío	Incubación ADN/spz
	Cerdo	Incubación ADN/spz
	Cerdo	Electroporación
	Búfalo	Incubación ADN/spz
	Toro	Incubación ADN/spz
	Toro	Electroporación
	Humano	Incubación ADN/spz

et al. 1992; Sin et al. 1993; Symonds et al. 1994a; Patil & Khoo 1995; Sarangi et al. 1999; Zhong et al. 2002; Venugopal et al. 2004), **aves** (*Castro et al. 1991; Gruenbaum et al. 1991; Rottmann et al. 1992*), además de **bovino** (*Castro et al. 1991; De la Fuente et al. 1990; Pérez et al. 1991*), **cerdo** (*Castro et al. 1991; Horan et al. 1991, 1992a, 1992b; Sperandio et al. 1996; Sciamanna et al. 2000; Lai et al. 2001; Chang et al. 2002 Lavitrano et al. 2003; Nagashima et al. 2003*), **carnero** (*Castro et al. 1991*), **macho cabrío** (*Castro et al. 1991;*

Schellander *et al.* 1995), **monos** (Chan *et al.* 2000a, 2000b) y en **humano** (Clausen *et al.* 1991; Cabrera *et al.* 1997).

Esta interacción ha sido mejorada mediante el uso de la electroporación en espermatozoides de peces (Mueller *et al.* 1992; Khoo *et al.* 1992; Sin *et al.* 1993; Symonds *et al.* 1994b; Patil & Khoo 1996; Sin *et al.* 2000; Venugopal *et al.* 2004) y por el uso de liposomas en aves (Rottmann *et al.* 1992, 1996; Squires & Drake 1993; Nakanishi & Iritani 1993; Yang *et al.* 2004) y ratones (Bachiller *et al.* 1991; Rottmann *et al.* 1992; Sowa *et al.* 1995).

1.5.5 PRODUCCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS EN DIFERENTES ESPECIES MEDIANTE SMGT

Diversas son las técnicas reproductivas que se ha llevado a cabo para la obtención de embriones y animales transgénicos mediante SMGT. Entre ellas encontramos la fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), inseminación artificial (IA), inseminación quirúrgica, laparoscopia, transferencia de embriones, etc. A continuación, se describen algunas de dichas técnicas y las aplicaciones que se han llevado a cabo en el ámbito de la transgénesis con especial hincapié en el método de SMGT, y que quedan reflejadas esquemáticamente en la *tabla 1 (página 28)*.

1.5.5.1 Obtención de embriones transgénicos por FIV e ICSI mediante SMGT

La **fecundación *in vitro* (FIV)** ha sido definida como la penetración de espermatozoides capacitados en ovocitos maduros fuera del tracto genital femenino. Sin embargo, esta definición clásica ha sido hoy en día modificada con el desarrollo de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que se considera una variante de la FIV tradicional.

Se produjo un gran revuelo cuando en 1989 el grupo de *Lavitrano* obtuvo F₁ de **ratones** transgénicos producidos por **fecundación *in vitro*** de ovocitos con espermatozoides epididimarios incubados con plásmidos. Numerosos grupos de investigación intentaron reproducir la técnica descrita por *Lavitrano* pero Brinster *et al.*, en 1989, publican un estudio donde de 1300 descendientes

analizados no obtuvieron los resultados esperados. Estos mismos autores reflexionaron sobre esta cuestión y concluyeron "...quizás el próximo paso para los autores sea demostrar dichos procedimientos en otros laboratorios pudiendo así observar los elementos esenciales de su método que hemos eludido nosotros y otros...".

En 1998, *Maione et al.*, obtuvieron descendencia de ratones transgénicos por transferencia de embriones fecundados *in vitro*. Los espermatozoides fueron incubados con el plásmido durante el periodo de capacitación y después añadidos a ovocitos de ratón recién obtenidos, los embriones divididos fueron transferidos a los oviductos de hembras receptoras. De un total de 75 experimentos, 13 de ellos dieron lugar a 130 transgénicos, un 7.4% del total de los fetos. En 5 experimentos más del 50% de la descendencia fueron transgénicos, pero los factores de este alto rendimiento no fueron descubiertos. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el laboratorio de reproducción biológica en Boston para la realización de la FIV. Los primeros 24 experimentos fueron llevados a cabo en Boston, y los siguientes 52 experimentos se realizaron en Roma con los medios de cultivo de Boston. Con este hecho demostraron que la técnica se podía repetir en diferentes laboratorios de todo el mundo, respondiendo así al desafío propuesto por *Brinster*.

En el año 2002, *Chang et al.* realizan una modificación de la técnica usando anticuerpos monoclonales que sirven como nexo de unión entre los espermatozoides y el ADN exógeno. Los resultados obtenidos no supusieron la mejora esperada, teniendo finalmente mediante **FIV** un 33% de embriones transgénicos de **ratón**.

Uno de los principales problemas que presenta la FIV en la especie porcina en la actualidad es la elevada tasa de polispermia, posiblemente debido a que el número de espermatozoides utilizado es demasiado alto en comparación con la fecundación *in vivo* (Hunter 1999). Se ha especulado que parte del problema de la polispermia sea debido a una inadecuada maduración ovocitaria; sin embargo, cuando se utilizan ovocitos recién ovulados y fecundados *in vitro* se obtienen también fecundaciones polispérmicas (Coy *et al.* 1993a, 1993b, 1993c; Martínez *et al.* 1993). Además, se han obtenido lechones mediante la transferencia de ovocitos madurados *in vitro* (MIV) a una hembra receptora y posteriormente inseminada (Coy *et al.* 1999), lo cual también indica que el problema de la polispermia podría ser inherente a la FIV y no a la MIV. En la actualidad, mientras no se consiga identificar el factor o factores que impiden el adecuado

establecimiento de la reacción de zona *in vitro* para bloquear la polispermia, la técnica de ICSI se presenta como una alternativa importante en la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

Otras variables estudiadas en relación a la FIV son la concentración espermática (Coy *et al.* 1993b; Xu *et al.* 1996; Martínez 2002), el tiempo de coincubación espermatozoide-ovocito (Coy *et al.* 1993c; Martínez 2002), la procedencia de los espermatozoides (Rath & Niemann 1997), el volumen del medio de cocultivo (Coy *et al.* 1993a) y tratamientos de lavado espermático, centrifugación o selección previa a la FIV (Matás *et al.* 2003).

En 1992 (Horan *et al.* 1992b) se hizo público el primer estudio de espermatozoides de cerdo incubados con ADN exógeno. Estos autores determinaron la unión del ADN exógeno a los espermatozoides de **cerdo** que han sido capacitados y reaccionados *in vitro* usando ionóforo de calcio, y luego usados en **FIV** en ovocitos de hámster sin zona pelúcida y en ovocitos porcinos con la zona intacta. Se observó que de los espermatozoides reaccionados más del 70% tenían el ADN exógeno en la región postacrosomal. Se fecundaron los ovocitos y se vio que alrededor del 54% de los ovocitos fecundados tenían las cabezas espermáticas descondensadas encontrándose el transgén en la región postacrosomal. El resto se cultivó 15-17 h, y tras la fijación, se determinaron un 30% de ovocitos de hámster y un 10% en cerdo con pronúcleo espermático usando la peroxidasa como sistema de visualización. Finalmente, no fue posible determinar si alguno de esos pronúcleos contenía el ADN exógeno.

Se han probado diferentes tratamientos y tamaños del plásmido para optimizar y mejorar la técnica de obtención de embriones transgénicos. Sperandio *et al.* (1996) compararon mediante **FIV** la producción de embriones transgénicos en **bovino** utilizando 3 plásmidos con diferentes tamaños: pSV2CAT (5003 pb), pRSV-LT (9035 pb), pALu (8081 pb). Los blastocistos fueron analizados mediante PCR. Los resultados se muestran en la *tabla 3*.

TABLA 3. Resultados de blastocistos transgénicos de bovino obtenidos mediante FIV-SMGT (Sperandio *et al.* 1996).

Plásmido	Blastocistos analizados	Blastocistos positivos (%)
pSV2CAT	677	149(22)
pRSV-LT	94	2(2.1)
pALu	205	2(0.4)

En principio una de las explicaciones a estos resultados sería que los diferentes tamaños de plásmidos utilizados juegan un importante papel siendo los de menor tamaño los que dan lugar a tasas mayores de transgénicos, por el hecho de que las moléculas más pequeñas de ADN son captadas más fácilmente por el espermatozoide. Sin embargo, los análisis llevados a cabo *in vitro*, muestran que la asociación entre los espermatozoides y el ADN de los plásmidos utilizados se interiorizan todos de una manera eficiente en el núcleo espermático (Sperandio *et al.* 1996).

Otra de las variantes utilizadas fue el uso de semen congelado sometido a electroporación y coincubado con GFP con el promotor β -actina (Rieth *et al.* 2000). En este estudio se realizó **FIV** en **bovino** con ovocitos de MIV, y de los 29 embriones obtenidos y analizados, solo uno resultó ser transgénico (3.5%). Gagné *et al.* (1991) y Sperandio *et al.* (1996) publican un porcentaje de éxito del 12% y 22%, respectivamente, en embriones bovinos obtenidos por FIV con espermatozoides incubados con el ADN, siendo estos resultados mayores que en el estudio realizado por Rieth. Sin embargo, ellos no reflejan la integración del transgén sino la presencia de algunas copias del plásmido, por lo que pudo conducir a algunos falsos positivos en la amplificación por PCR. No se observó expresión de la GFP en ninguno de los embriones, pero se ha publicado que la presencia del promotor CMV (recordamos que en esta experiencia se utilizó el promotor β -actina) mejora significativamente la expresión de la GFP, por lo que se sospecha que esta baja eficiencia de la expresión se debe a este hecho. Resultados similares fueron obtenidos por Hoelker *et al.* (2007), quienes realizan **FIV bovina** utilizando espermatozoides congelados-descongelados incubados con el transgén CMV-INF-t-IRES-EGFP, observando que únicamente 6 blastocistos (3.6%) expresaban GFP.

El uso de protaminas unidas al transgén para protegerlo de la lisis de las nucleasas fue realizado por *Alderson et al.* 2006. Estos autores realizaron **FIV** en **bovino** con dos tipos de plásmidos (pCX-EGFP y pCX-EGFP-protaminas). El análisis por PCR mostró que los blastocistos tenían incluido el plásmido (14.6% vs. 10.2%), sin que mejoraran las tasas de producción de embriones transgénicos con la utilización de las protaminas. Sin embargo, cuando los blastocistos fueron analizados por el microscopio de fluorescencia, ninguno de ellos mostró niveles detectables de fluorescencia verde asociada a EGFP. En este estudio, el número de blastocistos positivos para la PCR fue menor que el observado en otros trabajos de SMGT bovina (*Shemesh et al.* 2000; *Sperandio et al.* 1996), donde se incubó una menor cantidad de ADN con los espermatozoides.

Además de las especies ya mencionadas anteriormente, hay otras donde se ha utilizado la fecundación *in vitro* como método de elección para aplicar la SMGT. Algunas de estas son el erizo de mar (*Arezzo* 1989), pez cebra (*Khoo et al.* 1992), salmón (*Sin et al.* 1993), el molusco *Abalone* (*Tsai et al.* 1997). También se han logrado obtener anfibios transgénicos (*Xenopus Laevis*) mediante FIV con una eficiencia del 23% (*Jonak* 2000), además se consiguió transmitir el gen a la siguiente generación con una alta eficiencia (50%).

Como hemos podido comprobar el éxito de la obtención de embriones transgénicos mediante FIV es muy dispar entre especies e incluso intraespecífica. Debemos tener en consideración que, a fecha de hoy, no existe ninguna publicación donde se obtengan embriones porcinos transgénicos mediante FIV.

La **inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)** es una técnica de reproducción asistida que consiste en la introducción de un único espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito maduro con la ayuda de un micromanipulador. Mediante esta técnica se salvan fases que son fundamentales en el proceso 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. Los primeros experimentos en mamíferos se realizaron con modelos animales, principalmente hámster y ratón (*Uehara & Yanagimachi* 1976; *Kimura & Yanagimachi* 1995), antes de conseguir fecundación mediante ICSI en el hombre (*Van Steirteghem et al.* 1993). Sin embargo, la aplicación en las especies domésticas tales como la vaca, el caballo o el cerdo, no ha avanzado en la misma medida y están siendo el foco de atención de los programas de investigación de numerosos laboratorios.

La micromanipulación en ratones y animales domésticos ha sido usada en las dos últimas décadas para el desarrollo y perfeccionamiento de la tecnología de la clonación y de la producción de animales transgénicos (Nagashima *et al.* 2003), y en los programas de recuperación de especies en peligro de extinción (Iritani *et al.* 1998). También es de mucha utilidad en la producción de animales de granja de un sexo determinado (Probst & Rath 2003), o en la obtención de descendencia a partir de animales de baja capacidad fecundante en FIV o espermatozoides dañados, pero con elevado valor genético.

Las desventajas de la ICSI incluyen la necesidad de una compleja instrumentación, personal preparado y un efectivo protocolo de trabajo. En cerdos, además de estas dificultades hay que sumar las asociadas al desarrollo embrionario, elevada partenogénesis (Kolbe & Holtz 1999) y un número muy bajo de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (Klocke 1999).

Los primeros estudios en ICSI se realizaron en equinodermos (Hiramoto 1962) examinando la activación ovocitaria y los eventos post-fecundación. Posteriormente, la técnica fue utilizada en anfibios (Brun 1974). En cuanto a las primeras inyecciones en mamíferos, éstas se realizaron en hámster (Uehara & Yanagimachi 1976). Las primeras investigaciones de esta técnica en animales de interés zootécnico (Catt & Rhodes 1995) demuestran que ovocitos porcinos, ovinos y bovinos pueden dar lugar a formación pronuclear y desarrollo embrionario limitado sin activación exógena mediante la técnica de la ICSI.

Se ha obtenido descendencia viva mediante ICSI en diferentes especies. En ratones, *Lacham-Kaplan et al.* lo consiguieron en 1995. En conejos, *Hosoi et al.* (1993) obtuvieron una camada inyectando espermatozoides intactos en el citoplasma de ovocitos madurados *in vivo*. En vacuno, *Goto et al.* (1990) obtuvieron descendencia viva mediante ICSI de espermatozoides muertos. Los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento con ionóforo de calcio para inducir la activación. También se ha obtenido descendencia viva en la especie ovina (Catt 1996), felina (Pope 1998) y equina (Grondahl *et al.* 1997).

La ICSI en la especie porcina está experimentando un gran desarrollo como técnica, permitiendo reducir la polispermia, uno de los principales problemas de la FIV porcina, ya que sólo un espermatozoide se inyecta en el interior de un ovocito.

La obtención de lechones viables mediante esta técnica de fecundación es todavía extremadamente baja y únicamente unos pocos grupos de investigación han obtenido nacimientos de lechones vivos. Los primeros lechones obtenidos fueron en el 2000 (Kolbe & Holtz 2000; Martin 2000) con ovocitos madurados *in vivo*. Posteriormente, en 2001, *Lai et al.* obtuvieron el primer lechón (muerto al nacer) procedente de la inyección de ovocitos madurados *in vitro* y para ello fue necesaria la activación mediante pulsos eléctricos. *Probst & Rath* en 2003 obtuvieron 13 lechones en 4 camadas procedentes de la inyección de espermatozoides sexados y ovocitos madurados *in vivo*, en los que la activación se estimuló mediante la inyección de Cl_2Ca .

En 2003, otro grupo de investigación publica el nacimiento de tres lechones mediante la utilización de ovocitos madurados *in vitro* y activados mediante pulsos eléctricos (*Nakai et al.* 2003). Recientemente, en 2007, *Katayama et al.* obtienen 3 gestaciones de 7 transferencias realizadas con embriones tratados con cisteína, obteniendo una media de 3 lechones por camada, usando ovocitos madurados *in vitro*.

El primer trabajo donde se utiliza la ICSI junto con la técnica de SMGT fue el de *Perry et al.* 1999, llevando a cabo la producción de **ratones** transgénicos. Dichos autores consiguen altas tasas de blastocistos transgénicos utilizando espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos. Cuando las membranas de los espermatozoides son alteradas mediante detergentes (Tritón X-100), o sufren el proceso rápido de congelación-descongelación, existe un número de blastocistos que expresan el ADN exógeno mayor que cuando se inyectan espermatozoides frescos no alterados (*Ver tabla 4*).

TABLA 4. Resultados de blastocistos transgénicos de ratón obtenidos mediante ICSI utilizando diferentes tratamientos de permeabilización de las membranas espermáticas (*Perry et al.* 1999).

Tratamiento	Blastocistos fluorescentes	Ratones
Fresco	26% (34/134)	
Tritón X-100	64% (137/212)	19% (6/31)
Congelación	82% (127/155)	16% (2/12)
Congelación-deseccación	87% (134/154)	21% (3/14)

En otro estudio (Naruse *et al.* 2005), introducen el gen de la albúmina humana recombinante (hAlb) asociado al gen EGFP como marcador de aquellos **ratones y cerdos** que fueran transgénicos. Para este estudio utilizan semen **congelado-descongelado** epididimario en ratones y eyaculado en porcino incubado con ADN. En este mismo estudio se comparan la eficiencia en la producción de ratones transgénicos utilizando la microinyección pronuclear y la **ICSI-SMGT**. Cuando usan la SMGT en ratones, los ratios de división embrionaria temprana (97.5%, 39/40) y de blastocistos (62.5%, 25/40) son similares a los obtenidos por microinyección pronuclear, pero la proporción de blastocistos que expresan la GFP es significativamente mayor en el grupo de la SMGT (60%, 15/25 vs. 4.3-20.6%).

Moreira et al. (2004) demuestran la capacidad de transferir, por este sistema, ADN de gran tamaño y con una mayor eficiencia que la microinyección pronuclear. En 2007, *Moreira et al.* demuestran además que el uso del sistema ICSI-SMGT puede transferir concentraciones de ADN mayores que con la microinyección pronuclear.

Con la técnica de **ICSI-SMGT** se han obtenido los primeros **monos** transgénicos mediante la transferencia de estos embriones (Chan *et al.* 2000a). La expresión de GFP solo se observó en embriones creados por ICSI (34.6%) y no por **FIV**. La fecundación por ICSI excluye la interacción de la membrana plasmática por lo que no excluye los genes exógenos adheridos al espermatozoide.

En la especie **porcina**, *Shim et al.* (2000) y *Lee et al.* (2003) obtienen mediante **ICSI** embriones transgénicos, utilizando espermatozoides con membranas dañadas ya sea de manera química o física. Los resultados de estos trabajos se muestran en las *tablas 5 y 6*.

TABLA 5. Resultados de blastocistos transgénicos en porcino obtenidos mediante ICSI utilizando dos tratamientos químicos de permeabilización de las membranas espermáticas (Shim *et al.* 2000).

Tratamiento	Blastocistos analizados (%)	Expresión GFP (%)
Tritón 0.02%	42/70(60%)	10/17(59%)
1M NaOH	28/70(40%)	2/17(12%)
Control	34/70(49%)	-

TABLA 6. Resultados de blastocistos transgénicos en porcino obtenidos mediante ICSI utilizando dos tratamientos físicos de permeabilización de las membranas espermáticas (Lee *et al.* 2003).

Tratamiento	Blastocistos analizados (%)	Expresión GFP (%)
Congelación-descongelación	26%	81%
Congelación-deseccación	28%	78%
Control	32%	-

En los resultados de ambas investigaciones, el porcentaje de embriones transgénicos obtenidos utilizando espermatozoides con las membranas dañadas es claramente superior que cuando se utiliza semen intacto. Confirmando estos datos el estudio de Perry en 1999 con espermatozoides de ratón.

Otros estudios (Lai *et al.* 2001; Bolling *et al.* 2003) han comparado la producción de embriones **porcinos** transgénicos usando **FIV** e **ICSI**. Lai *et al.* (2001) compararon la eficiencia de la técnica en **FIV** e **ICSI** de **porcino**, realizando 3 grupos que detallamos a continuación: ICSI (espermatozoides incubados con d2EGFP y liposomas), FIV (igual que ICSI) y FIV en la que primero inyectan ADN/liposomas y posteriormente fecundan con espermatozoides. En la *tabla 7* quedan reflejados los resultados de este estudio, donde el porcentaje de embriones transgénicos con expresión fue de 29.4% en el grupo de ICSI, en un rango de desarrollo embrionario entre 2 células y estadio de blastocisto. Para los 2 grupos restantes ninguno de los embriones en ningún estadio expresó la proteína.

TABLA 7. Desarrollo *in vitro* de embriones mediante FIV e ICSI derivados de SMGT con GFP (Lai *et al.* 2001).

Método fecundación	Blatocistos (%)	Expresión (%)
ICSI	34(17.8±13.1)	30(29.4)
FIV	41(22.7±6.4)	0
Inyección ADN+FIV	8(21.1±1.5)	0

Bolling et al. (2003) estudiaron 4 grupos experimentales: 1) ICSI usando espermatozoides con las membranas dañadas (congelados-descongelados) incubados con ADN (GFP); 2) ICSI usando espermatozoides con las membranas dañadas; 3) FIV con espermatozoides congelados-descongelados incubados con GFP; 4) FIV con espermatozoides congelados-descongelados sin ADN. El porcentaje de embriones que expresan el gen GFP, en el día 6 tras la fecundación, fue de 7.3% en el grupo ICSI+GFP y de 0% en el resto de los grupos. No se observaron diferencias en el desarrollo embrionario entre los diferentes grupos. La mayoría de los embriones examinados (11/17) para GFP eran mosaicos.

1.5.5.1.1 "Transgénesis activa": Uso de la recombinasa RecA

Existen numerosos métodos pasivos de transgénesis, como la microinyección pronuclear, o ICSI-SMGT. Este último método, como ya hemos comentado, se muestra eficiente en la producción de animales transgénicos con una transfección del transgén en aproximadamente el 45% de los animales nacidos (*Shinohara et al.* 2007). Sin embargo, usando estas técnicas se ha visto que algunos de los animales producidos son mosaicos. Existe un nuevo método activo que combina ICSI-SMGT con recombinasas o transposasas, y ha sido desarrollado para incrementar la eficiencia de la transmisión genética. Esta técnica, denominada "Transgénesis activa", implica que el transgén es insertado en el genoma hospedador con la ayuda de enzimas. Entre estas se encuentran las proteínas transposasas (transposasa hiperactiva Tn5) (*Suganuma et al.* 2005) o recombinasas (RecA) (*Kaneko et al.* 2005). A continuación describimos la recombinasa RecA:

1) Estructura y características de la recombinasa RecA

La proteína RecA de *E. coli* es un polipéptido con un peso molecular de 37.842 Dalton y un punto isoeléctrico de 5.6. Bajo unas condiciones de crecimiento normales existen de 8.000 a 10.000 monómeros de proteína RecA por célula, un número que puede incrementarse a 70.000 cuando existe un daño en el ADN y están presentes los agentes que inducen la respuesta al daño. RecA está presente en todas las bacterias (Cox 2003) y también ha sido detectada en células eucariotas (Brendel *et al.* 1997). La proteína recombinasa A de *E. coli* juega un papel central en la recombinación homóloga y la reparación del ADN (Kowalczykowski & Egglestone 1994; Shinohara & Ogawa 1995).

RecA se une a cadenas simples de ADN (ssADN), lo que representa el proceso central en cualquier recombinación genética homóloga, para formar un filamento nucleoproteico con un monómero de RecA cada 3-4 nucleótidos de ADN (Cox & Lehman 1987), que protege completamente el ADN de la digestión por fosfodiesterasas y nucleasas (Yu & Egelman 1992). El complejo RecA:ssADN es estable y puede ser usado en la microinyección pronuclear de cigotos y por lo tanto sirve para evaluar los efectos de la protección de la proteína RecA sobre las cadenas de ADN en el proceso de transgénesis (Maga *et al.* 2003); es probable que además, juegue también un papel enzimático en la integración del transgén, aunque no está claro este último mecanismo (Kaneko *et al.* 2005).

2) Resultados obtenidos con el uso de RecA

Este mecanismo de protección influye en la estabilidad de las cadenas ssADN durante la microinyección pronuclear utilizando los complejos RecA:ssADN en cerdos y cabras (Maga 2001). Esta protección del RecA sobre las cadenas de ssADN determinó una mayor supervivencia embrionaria y una mayor frecuencia de integración del transgén (3.25% vs. 0.3%), indicando que la proteína RecA juega un importante papel en la protección del ADN (Maga *et al.* 2003). Sorprendentemente, la mayor parte de la descendencia obtenida con esta técnica fueron mosaicos (Maga *et al.* 2003). Kaneko *et al.* 2005, realizan un estudio en ratón mediante ICSI con complejos espermatozoides:RecA:ssADN, comparándolos con complejos sin la presencia de RecA, únicamente espermatozoides:ssADN (control). A continuación, en la tabla 8, se presentan los resultados obtenidos:

TABLA 8. Resumen de los experimentos de transgénesis mediante RecA-ICSI en ratón (Kaneko *et al.* 2005).

Complejo	Concentración ADN (ng/ μ l)	Ovocitos inyectados	Nºembriones 2 cel positivos EGFP	Nº embriones transferidos (receptoras)	Lechones nacidos (% transferidos)	Crías transgénicas (% nacidos)
ssADN	5	84	10	54(4)	29(54)	0(0)
ssADN	10	55	11	30(3)	15(50)	0(0)
ssADN+RecA	5	90	19	69(6)	45(65)	6(13.3)
ssADN+RecA	10	69	21	56(4)	27(48)	2(7.4)
ssADN+RecA	20	52	12	36(3)	10(28)	2(40)
ssADN+RecA	40	55	13	51(4)	34(67)	2(5.9)

La expresión de EGFP fue detectada en el 18-37% de los embriones de 2 células, independientemente del uso o no de RecA. El resultado de los nacimientos varió entre un 28-67% de los embriones transferidos. El ratio de supervivencia embrionaria fue superior a los obtenidos con espermatozoides congelados con unos rangos entre 20-36% (Perry *et al.* 1999). Una probable explicación es que al no utilizar tratamientos espermáticos tales como congelación o el uso de detergentes como Tritón X-100, se mantuviera así la integridad del genoma espermático (Kaneko *et al.* 2005). Finalmente, solo obtuvieron descendencia que expresaba la EGFP cuando utilizaron la proteína RecA. La eficiencia de la transgénesis, determinada por el porcentaje de animales transgénicos nacidos, varió entre 5.9-40% con el complejo RecA. Sin embargo, la transgénesis mediada por RecA-ICSI en estos experimentos, condujo a que toda la descendencia fuera transgénica y no se demostró ningún patrón de expresión mosaico, tal y como muestra la *figura 24*. Estos resultados muestran que el proceso de transgénesis mediante RecA-ICSI es un proceso RecA dependiente.

FIGURA 24. Imagen de dos ratones obtenidos mediante ICSI-SMGT utilizando complejos RecA:ssADN. Uno de ellos (ratón de la derecha) es transgénico para GFP (Kaneko *et al.* 2005).



Hirabayashi en 2006 compara ambos métodos, microinyección pronuclear e ICSI, con y sin RecA, en ratas. Sus resultados demostraron que para la **microinyección pronuclear** con el uso de RecA, la división embrionaria temprana fue mayor que en el grupo sin RecA, mientras que la supervivencia de los cigotos no estuvo influenciada por la protección del ADN con la proteína RecA. La producción de descendencia con el transgén EGFP fue similar en ambos casos para la microinyección pronuclear (2.9 vs. 0.9% con RecA). Para el caso de **ICSI**, la división embrionaria de los ovocitos inyectados con RecA:ADN (57%) fue mayor que sin su uso (29%). Sin embargo, la supervivencia post-ICSI (85-89%) no estuvo influenciada por la protección de RecA sobre el ADN. No hubieron ratas transgénicas entre las 39 crías que nacieron tras 126 ovocitos inyectados con ssEGFP:RecA unidos a los espermatozoides, mientras que se dio lugar a 4 crías tras la transferencia de 103 ovocitos mediante la ICSI tradicional. Debido a la larga superficie de las cabezas espermáticas en las ratas si la comparamos con los ratones, la exposición a altas concentraciones de ADN exógeno puede crear un exceso en esta asociación; la introducción de cabezas espermáticas con exceso de ADN dentro de los ovocitos mediante ICSI puede tener un efecto tóxico en el desarrollo de los ovocitos. RecA se une a las cadenas simples de ADN protegiendo a éste de posibles degradaciones por fosfodiesterasas y nucleasas. Estas características de RecA pueden explicar la alta división embrionaria (en caso de la microinyección pronuclear) y la supervivencia *in vivo* de los ovocitos de rata microinyectados (*Hirabayashi et al.* 2006).

Moreira et al. 2007, publicaron que la eficiencia de la ICSI para la producción de ratones transgénicos fue similar cuando se utilizó semen fresco de

epidídimo y RecA:ADN, a la que se obtuvo cuando se utilizó semen congelado-descongelado (38% vs. 45%).

1.5.5.2 Uso de la inseminación artificial (IA) como método para la obtención de animales transgénicos por SMGT

La posibilidad de usar el SMGT con la IA supone grandes ventajas, ya que se reduce a la mínima expresión el coste y la complejidad técnica para la obtención de animales transgénicos.

Se ha usado esta técnica en porcinos (Gandolfi *et al.* 1996; Sperandio *et al.* 1996; Lavitrano *et al.* 2003) y bovino (Schellander *et al.* 1995; Shemesh *et al.* 2000). También se han llevado a cabo inseminaciones, utilizando la SMGT, en otras especies como en conejo (Brackett *et al.* 1971; Wang *et al.* 2003), cabras (Schellander *et al.* 1995), abejas (Robinson *et al.* 2000), ratas (Yonezawa *et al.* 2002) y pollos (Yang *et al.* 2004). El rendimiento final es muy diverso entre autores y entre especies, así por ejemplo en cerdo varía de un 0% (Gandolfi *et al.* 1996) hasta cerca de un 80% (Lavitrano *et al.* 2002), en la obtención de lechones transgénicos por inseminación.

Durante una inseminación artificial porcina convencional, a pesar del alto número de espermatozoides depositados en el útero ($3-8 \times 10^9$) solo unos pocos cientos de espermatozoides pueden ser encontrados en el istmo en el momento de la ovulación debido al control de la unión utero-tubárica, al reflujo y la fagocitosis. Se han desarrollado otras tecnologías para mejorar el proceso de fecundación y disminuir el número de espermatozoides utilizados en el proceso. Entre estas técnicas se encuentran la inseminación intrauterina profunda (Martínez *et al.* 2001, 2002), la inseminación por laparoscopia (Fantinati *et al.* 2005). No obstante, algunas de estas técnicas requieren de personal especializado y una alta tecnología.

1.5.5.2.1 Inseminaciones convencionales

La inseminación artificial (IA) es la técnica individual más importante creada para la mejora genética de los animales de producción, además entre otras ventajas destacamos el control de enfermedades de transmisión sexual, económica, la mejora del rendimiento del macho, el uso de semen congelado, etc. En la actualidad, la inseminación artificial porcina es una técnica

reproductiva con una alta aplicación en todo el mundo, siendo en Europa su uso alrededor del 80%. Se han desarrollado importantes avances en la técnica de inseminación artificial porcina (mejora de los diluyentes, evaluación de la calidad, determinación del tiempo de ovulación, etc.), que han llevado a conseguir unos elevados rendimientos.

Recientemente, se ha desarrollado una técnica de inseminación intrauterina profunda mediante endoscopia en cerdas no sedadas (Martínez *et al.* 2001). El endoscopio fue reemplazado posteriormente por un catéter especial (Martínez *et al.* 2002) que puede ser usado para depositar un pequeño número de espermatozoides en el cuerno uterino. Estos autores obtuvieron buenos ratios de fecundación y de tamaño de la camada mediante esta sonda, pero la fertilidad se redujo significativamente cuando la concentración de espermatozoides fue menor de $2.5-5 \times 10^7$ (Martínez *et al.* 2002). Más recientemente el uso de esta sonda ha sido utilizada con semen congelado (Roca *et al.* 2003) y células espermáticas seleccionadas X e Y (Vázquez *et al.* 2003).

En lo que a la producción de transgénicos se refiere, Sperandio *et al.* (1996) compararon la producción embrionaria en porcino utilizando 3 plásmidos diferentes: pSV2CAT (5003 pb), pRSV-LT (9035 pb), pALu (8081 pb). Para ello, inseminaron cerdas con semen incubado con los diferentes plásmidos. A los 6 días postfecundación se procedió a la recolección de los embriones y a su análisis por PCR, los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 9*:

TABLA 9. Producción de blastocistos transgénicos en porcino utilizando 3 plásmidos diferentes (Sperandio *et al.* 1996).

Plásmido	Blatocistos analizados	Blastocistos positivos (%)
pSV2CAT	139	8(5.7)
pRSV	10	0(0)
pAGLu	110	4(3.6)

Como ya se ha comentado anteriormente en el *apartado 1.5.5.1*, en principio los diferentes tamaños de plásmidos utilizados juegan un importante papel siendo los de menor tamaño los que dan lugar a tasas mayores de transgénicos. En este mismo estudio se inseminaron 10 cerdas con semen

incubado con el plásmido pSV2CAT dando lugar a un total de 82 lechones, de los cuales 5 fueron transgénicos, obteniendo una eficiencia de un 6.1% muy similar a los resultados obtenidos mediante el análisis de los blastocistos (5.7%).

Pero sin duda el mayor éxito obtenido en la SMGT ha sido la producción de cerdos transgénicos para hDAF (Lavitrano *et al.* 1997a, 1999, 2002, 2003; Cappello *et al.* 2000; Lazzereschi *et al.* 2000; Smolenski *et al.* 2007). Esta proteína (hDAF) es un factor importante en la primera barrera de rechazo en modelos de trasplantes de cerdo a primate. Se inseminaron hembras prepúberes con semen (1×10^9 /hembra), previamente incubado 2 h a 16°C con ADN que contenía la construcción hDAF. Por esta técnica generaron alrededor de unos 100 cerdos transgénicos con este gen para ser usados en investigaciones de xenotrasplantes, y la eficiencia obtenida con SMGT fue mucho mayor que con ningún otro método (Lavitrano *et al.* 2002, 2003). Publicaron que aproximadamente el 80% de los cerdos tenían integrado el transgén en su genoma. La mayoría de los cerdos que llevaban el transgén hDAF lo transcribieron de una manera estable (64%) y la mayoría de los cerdos que transcribieron el transgén también expresaron la proteína (83%). Además este transgén fue transmitido a la progenie.

Recientemente, se ha publicado un estudio (Wu *et al.* 2007) donde se compara la producción de lechones transgénicos por SMGT mediante dos técnicas de inseminación artificial, convencional (cervical) e intrauterina. Los resultados demuestran que la inseminación intrauterina es más eficiente ya que obtienen casi un 30% de lechones transgénicos, mientras que con la inseminación cervical logran solamente un 3.4%.

1.5.5.2.2 Inseminaciones quirúrgicas

Otro método desarrollado es la deposición de los espermatozoides cerca de la unión útero tubárica (UTJ) que actúa, junto con el istmo, como un reservorio de espermatozoides donde éstos mantienen su estructura, motilidad, viabilidad y capacidad fecundante. En cerdo, la inseminación por laparotomía cerca del oviducto ha mostrado buenos resultados tanto en semen fresco (Krueger *et al.* 1999, 2000) como en congelado (Polge *et al.* 1970). Mediante esta técnica se han obtenido ratios de fecundación satisfactorios (90% de blastocistos usando 1×10^9 espermatozoides por cuerno (Fantinati *et al.* datos no publicados). Sin embargo, ésta técnica quirúrgica resulta estresante para la cerda y puede provocar adhesiones post-operatorias en el genital de la cerda

complican la posterior recolección de embriones. Estos procedimientos tienen la ventaja de que se deposita el semen cerca del lugar de fecundación y que se puede observar directamente el número y la calidad de los folículos preovulatorios (Fantinati *et al.* 2005).

La primera referencia del uso de las inseminaciones quirúrgicas en oviducto utilizando semen incubado con ADN, data del año 1996 cuando *Gandolfi et al.*, realizaron inseminaciones intratubáricas en 35 hembras obteniendo un total de 126 lechones. Ninguno de los lechones mostró signos de incorporación de ADN exógeno en ninguno de los tejidos analizados mediante PCR y *Southern Blot*.

En el año 2002 *Chang et al.* utilizan anticuerpos como nexo de unión entre los espermatozoides y el ADN. Se realizaron inseminaciones quirúrgicas depositando los espermatozoides en el oviducto (1.2×10^6 espermatozoides por oviducto) de cerdas receptoras. En un primer experimento se inseminaron un total de 27 cerdas, se obtuvieron 43 lechones procedentes de 7 cerdas (tasa de gestación del 26%). Un 13% de estos lechones fueron transgénicos. En un segundo experimento similar (se realizó con la idea de demostrar la repetitividad del mismo), se obtuvieron 32 lechones de 8 cerdas, con una tasa de gestación del 28%, siendo un 18% de estos lechones transgénicos.

En el año 2005, *Fantinati et al.*, llevaron a cabo inseminaciones laparoscópicas en el útero a 2 cm de la unión útero tubárica utilizando los espermatozoides como vehículos del plásmido EGFP. Los embriones fueron recolectados por laparotomía 6 días tras la fecundación, se realizó el lavado de los cuernos uterinos 2 veces con 20 ml de medio de lavado. En esta experiencia el número de cuerpos lúteos por cerda fue de 19.4 con un ratio de recuperación cercano al 96%. El porcentaje de embriones normales desarrollados fue de un 86%. En la observación de los blastocistos por el microscopio de fluorescencia, un alto porcentaje de ellos expresó la EGFP (80%).

Por otra parte, *Webster et al.* 2005 usaron la SMGT para producir con una alta eficiencia cerdos multitransgénicos. Se inseminaron las cerdas mediante laparoscopia o inseminación intrauterina. De 195 mórulas/blastocistos recogidos a los 6 días tras la inseminación, en 171 se expresaron las 3 proteínas fluorescentes (88%). Además, de 18 lechones nacidos, todos eran transgénicos para al menos un gen, 7 de ellos eran triple-transgénicos, 7 /18 eran dobles, y 4 eran transgénicos para un solo gen.

1.5.5.3 Obtención de animales transgénicos por SMGT mediante transferencia de embriones

En el cerdo, desde hace varias décadas se ha estado realizando la transferencia de embriones por vía quirúrgica. Sin embargo, en el campo relacionado con las aplicaciones comerciales sólo se ha utilizado de manera limitada debido a la necesidad de equipamiento, instalaciones adecuadas y anestesia.

Hasta el momento, se han utilizado 3 tipos de técnicas: 1) la transferencia quirúrgica clásica mediante laparotomía e introducción de los embriones en el oviducto o en el extremo del cuerno uterino dependiendo del estado de desarrollo, con porcentajes de gestación entre el 17 y el 100% y tamaños de camada entre 2.4 y 10.8 lechones (Cameron *et al.* 1990); 2) la técnica de laparoscopia, con porcentajes de éxito del 14 al 90% y tamaños de camada de 7 a 9 lechones (Besenfelder *et al.* 1998), y 3) los procedimientos no quirúrgicos, basados en el abordaje transcervical y la introducción de los embriones en el útero a través de sondas especiales, que tienen la ventaja de no precisar sedación en los animales, no ser invasivos y ser repetibles indefinidamente en el mismo animal. Los porcentajes de gestación en este caso varían entre 9-64% y el tamaño de las camadas de 3.1 a 10.9 lechones (Yonemura *et al.* 1996; Hazeleger *et al.* 2000). Recientemente, se ha desarrollado una nueva sonda para transferencia embrionaria tanto en hembras nulíparas como en múltiparas, que permite la introducción de los embriones por vía intrauterina profunda. Se ha obtenido también descendencia mediante esta sonda (Martínez *et al.* 2004) con unos porcentajes de gestación (70%) similares a los obtenidos por transferencia quirúrgica y una media de 7 lechones.

La edad del embrión es un dato muy importante a la hora de realizar las transferencias; dependiendo del estadio en que se encuentre se dispondrán en oviducto o útero receptor en las mismas condiciones que las que tendrá el útero de la hembra donante. Los mayores éxitos se han conseguido con la transferencia de embriones de 2-4 células en el oviducto o de blastocistos en el cuerno uterino y, mientras que en el primer caso no es posible el abordaje transcervical, en el segundo sí lo es.

Otros factores a tener en cuenta son las condiciones higiénicas. El uso de antibióticos y material estéril para prevenir contaminaciones aporta mayor probabilidad de éxito al procedimiento (Yonemura *et al.* 1996). En cuanto a la

edad de las hembras, normalmente se utilizan hembras primíparas porque son más fáciles de manejar y toleran mejor la anestesia y los procedimientos quirúrgicos que las cerdas adultas.

Por otra parte, en la producción de descendencia viva juega un papel clave el reconocimiento y mantenimiento de la gestación. Al menos dos técnicas se están empleando para ayudar en el reconocimiento y mantenimiento de la gestación tras la transferencia de embriones cultivados *in vitro*. La primera es la administración exógena de estrógenos, los cuales actúan alterando la liberación de prostaglandinas del útero (Frank *et al.* 1977). Estos estrógenos pueden administrarse entre los días 11 y 15 de gestación (Geisert *et al.* 1990). La segunda técnica consiste en la inducción de cuerpos lúteos mediante la administración de eCG y hCG en el día 9 y el día 12 de gestación respectivamente (Ellicot *et al.* 1973). Esta segunda población de cuerpos lúteos es refractaria a los efectos luteolíticos de la prostaglandina liberada alrededor del día 14 del ciclo estral original y proporciona una fuente continua de progesterona capaz de mantener la gestación (Bazer *et al.* 1982).

Varios son los trabajos publicados sobre la producción de cerdos transgénicos mediante la transferencia de embriones, producidos por el método ICSI-SMGT, a cerdas receptoras aunque el porcentaje de éxito sea muy variable entre los diferentes estudios (Lai *et al.* 2001; Naruse *et al.* 2005; Yong *et al.* 2006). Los primeros realizaron 5 transferencias de embriones producidos por ICSI en estadio de 8 células hasta mórula (entre 16 y 40 embriones transferidos por receptora). Cuatro de las hembras fueron transferidas con embriones producidos con semen congelado-descongelado incubado con el transgén, y se realizó una sola transferencia control sin el transgén. Esta última transferencia mencionada dio lugar a un lechón que murió nada más nacer (*Ver tabla 10*).

TABLA 10. Resultados transferencias de embriones (ICSI-SMGT) (Lai *et al.* 2001).

Tratamiento espermático	Nº embriones transferidos	Resultados gestación
ADN-	16	Un lechón nacido
ADN+	24	Actividad cíclica día 21
ADN+	40	Actividad cíclica día 75
ADN+	16	Actividad cíclica día 20
ADN+	18	Actividad cíclica día 36

Yong et al. en 2006, realizan 6 transferencias de ovocitos inyectados por ICSI con espermatozoides congelados procedentes de un verraco transgénico para la EGFP creado por *Cabot et al.* 2001, dando lugar a un solo lechón, que resultó ser transgénico para la EGFP. La *tabla 11* muestra los resultados obtenidos:

TABLA 11. Gestación y parto tras la transferencia quirúrgica de ovocitos MIV-ICSI utilizando espermatozoides de un cerdo transgénico para la EGFP (*Yong et al.* 2006).

Receptora	Nº ovocitos transferidos	Gestación	Nº lechones nacidos
431	90	-	—
467	171	+	1
445	43	-	—
421	45	+	—
442	45	-	—
466	58	-	—

La introducción del gen de la albúmina humana recombinante (hAlb) junto a EGFP como marcador del transgén, fue realizada por *Naruse et al.* (2005). Utilizaron semen congelado-descongelado incubado con el ADN. Introdujeron 614 ovocitos microinyectados en 3 cerdas receptoras, obteniendo dos gestaciones, aunque una de ellas perdió los embriones en el día 24 de gestación. Un lechón hembra nació a los 115 días tras la transferencia, pero murió a las pocas horas, mostró una clara expresión de la GFP en los globos oculares y en la piel, además una débil fluorescencia en la sangre y en otros órganos entre los que se incluye el hígado. Mediante PCR se comprobó que en todos los tejidos examinados se encontraba integrado el transgén. En este estudio, todos los embriones transferidos a las hembras receptoras expresaban EGFP (mediante previa selección en el laboratorio). Como resultado una sola transferencia dio lugar a descendencia viva. Este trabajo nos muestra que la selección de embriones usando la expresión de EGFP previa a la transferencia es un método ineficiente, por lo que embriones sin expresión no deben ser eliminados.

En el año 2006, *Kurome et al.* utilizaron la ICSI para la producción de cerdos transgénicos mediante la técnica de SMGT descrita anteriormente. El estudio se realizó con ovocitos madurados *in vitro* y espermatozoides congelados. También se valoró la posibilidad de que los cerdos transgénicos obtenidos pudieran ser clonados a partir de sus células somáticas. Se utilizó un

gen compuesto por EGFP y el gen de la albumina humana (hALB). La transferencia de 702 embriones producidos por ICSI-SMGT en 5 cerdas receptoras resultó en 4 gestaciones. En 3 de las hembras receptoras, que habían recibido un total de 312 embriones, se recogieron los fetos (un total de 32) y, uno de los fetos obtenidos resultó ser transgénico. Una de las hembras transferidas dio lugar al nacimiento de 3 lechones vivos, incluido uno transgénico que mostró una fuerte fluorescencia verde en los globos oculares, mucosas orales y tejidos subcutáneos. El microscopio de fluorescencia mostró una expresión de la GFP uniforme en las líneas celulares de hígado, músculo y pulmón. La transferencia nuclear de estas células en ovocitos receptores, resultó en un estable desarrollo *in vitro* de embriones clonados, en un rango entre 12.9 a 19.8%. Cuando 767 de los embriones obtenidos mediante transferencia nuclear fueron transferidos a 5 receptoras, todas resultaron gestantes y dieron un total de 6 lechones vivos clonados y transgénicos. En la *tabla 12* podemos apreciar los resultados obtenidos:

TABLA 12. Producción de fetos y lechones transgénicos procedentes de embriones porcinos obtenidos mediante el método ICSI-SMGT (Kurome *et al.* 2006).

Receptoras	Nº embriones transferidos	Nº fetos o lechones obtenidos	Nº fetos o lechones transgénicos
Nº1	113	12	1
Nº2	112	14	-
Nº3	87	6	-
Nº4	154	3	1
Nº5	236	-	-

*Receptoras nº1-3 fueron necropsiadas en días 20-28 de gestación, mientras nº4 fue llevada a término.

FIGURA 25. Imágenes de un lechón (a) y un feto (b), obtenidos mediante ICSI-SMGT, que expresan la proteína GFP (Kurome *et al.* 2006).



Como hemos podido comprobar en estos estudios donde el fin último es la obtención de animales transgénicos mediante transferencia de embriones, el éxito de dichas transferencias no es muy elevado tanto a nivel de gestación como por el número de lechones obtenidos. Las causas de esta baja eficiencia pueden ser varias:

- ✓ Estadío de desarrollo de los embriones
- ✓ Lugar de deposición de los mismos
- ✓ Calidad y número de embriones transferidos
- ✓ Proceso de transferencia
- ✓ Estrés pre y post-operatorio del animal
- ✓ Reconocimiento y mantenimiento de la gestación

1.6 VENTAJAS EN EL USO DE SMGT

La SMGT ha demostrado ser de gran aplicabilidad en numerosas especies animales incluyendo mamíferos, aves, peces e insectos. Es notorio que el éxito es mayor en las especies acuáticas, pudiendo convertirse en un futuro no muy lejano la técnica de elección de transgénesis en este tipo de especies. La transgénesis mediante SMGT es una técnica de muy bajo coste, sobre todo, al combinarla con técnicas como la inseminación artificial (IA) o en medios naturales en el caso de especies acuáticas.

Estas son algunas de las ventajas que presenta la técnica de SMGT frente a la microinyección pronuclear:

- 1) La frecuencia de producción de animales transgénicos mediante SMGT se encuentra alrededor de 50-60%, contrastando con la eficiencia de 0.5-4% usando la microinyección (Niemann & Kues 2000).
- 2) Los espermatozoides incubados con ADN pueden ser usados para inseminaciones artificiales que se practican comúnmente en las granjas, mientras que la microinyección requiere de un equipamiento costoso (superovulación, recolección e inyección de cigotos) con el posterior sacrificio de las donadoras y de los embriones porcinos.
- 3) Se puede reducir notablemente el coste de un animal transgénico obtenido por microinyección (25.000\$), mientras que usando SMGT los costes serían de unos 1000\$ (Wall 1996).
- 4) La microinyección en porcino da lugar a 2-3 descendientes mientras que la SMGT entre 6-14.

Con todo lo explicado anteriormente la SMGT se presenta como un método eficiente y barato, que podría ser utilizado para la introducción de genes específicos en los animales de granja.

1.7 CONTROVERSIAS CON LA TÉCNICA DE SMGT

A pesar de los éxitos obtenidos mediante la SMGT, todavía no se ha establecido como un método de manipulación genética. Un aspecto significativo es que la integración estable del transgén ha sido detectada con dificultad mediante esta técnica de transgénesis. Existe un cierto escepticismo basado en que podría producirse el mayor caos evolutivo si resulta que las células espermáticas son capaces de actuar como vectores de secuencias genéticas exógenas. Los tractos reproductivos contienen moléculas de ADN "libres" (procedentes de la muerte celular natural), y es razonable esperar que las células espermáticas sean altamente resistentes a la hora de capturar determinadas moléculas. Dado que la SMGT ha sido demostrada en numerosos trabajos, y todavía no se ha producido un caos evolutivo en la naturaleza, es de prever que existen formidables barreras en los espermatozoides a la hora de capturar ADN, aunque estas barreras no son totales. Al menos dos barreras han sido detectadas que evitan la unión e integración de moléculas exógenas en los espermatozoides de mamíferos: (1) un factor inhibidor (IF-1), abundante en el fluido seminal o unido a la membrana espermática en animales marinos, (2) actividad nucleasa endógena en el espermatozoide.

Desde 1989 hasta 2004 se han publicado alrededor de 30 trabajos usando la técnica SMGT para la producción de animales transgénicos viables. Sin embargo, solo una minoría (~25%) de esos trabajos demuestran la transmisión del transgén a la descendencia. Claramente la transmisión de los transgenes más allá de la F_0 podría considerarse un requisito indispensable para usar la técnica como transgénesis animal. Algunos autores (Spadafora 1998), sugieren que la baja frecuencia de esta transmisión puede explicarse por el inesperado mecanismo de interacción, presentándose los transgenes como episomas en las células de la F_0 , perdiéndose para la siguiente generación.

De hecho numerosos trabajos únicamente muestran transmisión, y solo algunos pocos muestran la integración, estos datos sugieren que deben existir factores no conocidos que inducen la integración en algunos de los experimentos. La evidencia más clara de integración se ha obtenido con la ICSI y mediante el uso de liposomas. Por el contrario, se han mostrado bajos niveles de integración con la interacción directa entre espermatozoides y ADN. Según la hipótesis planteada por Spadafora, una posible interpretación de estos resultados es que la membrana plasmática de los espermatozoides juega un papel crucial: cuando la membrana está intacta, como ocurre en la interacción directa espermatozoide-ADN, la unión de las moléculas de ADN a la superficie de la célula desencadena el mecanismo de interiorización y como consecuencia ocurre una transcripción inversa, formando mayoritariamente la generación de moléculas episomales de ADN. Por otro lado, la destrucción o "bypass" (usando liposomas) de la membrana, facilita la interacción directa con la cromatina de los espermatozoides incrementando la posibilidad de integración. La integración puede ocurrir tempranamente en el núcleo espermático (espermatozoides transgénicos) o más tarde en los ovocitos, cuando el núcleo espermático se convierte en el pronúcleo masculino.

Como hemos podido comprobar en esta revisión bibliográfica, los rendimientos obtenidos en la producción de embriones transgénicos son muy bajos. Entre éstos, los numerosos trabajos publicados mediante SMGT-FIV, como es el caso de bovino (Sperandio *et al.* 1996; Rieth *et al.* 2000; Hoelker *et al.* 2007), o incluso resultados nulos como sucede en porcino (Lai *et al.* 2001; Bolling *et al.* 2003). Sin embargo, el éxito se hace patente cuando se utiliza la IA con "semen transgénico", pero se obtienen resultados muy variables entre laboratorios (del 0% de cerdos transgénicos obtenido por Gandolfi *et al.* 1996, al 80% obtenidos por Lavitrano en sus diferentes publicaciones). La SMGT no se ha establecido todavía como método de transgénesis si lo comparamos con la

microinyección pronuclear o transferencia nuclear con células embrionarias indiferenciadas, debido a que todavía es difícil de predecir el trabajo rutinario de transgénesis (Smith & Spadafora 2005).

1.8 RECIENTES AVANCES EN SMGT

Se ha visto en un relativo corto periodo de tiempo, que el método de incorporación del ADN en la cabeza del espermatozoide, es una técnica reproducible, simple y rápida para producir mamíferos transgénicos. Lógicamente la fase de incorporación del ADN exógeno al espermatozoide es el paso crítico de este método. Numerosos equipos de investigación han desarrollado recientemente nuevos procedimientos o usado tratamientos químicos para mejorar la transferencia de genes al espermatozoide antes de la fecundación.

Un interesante y reciente desarrollo en la SMGT ha sido la introducción de transgenes dentro de células indiferenciadas del testículo *in vivo* (**TMGT**). Esta técnica combina las ventajas de crear "espermatozoides transgénicos" e investigar la función de los genes que intervienen en la espermatogénesis. Los resultados preliminares en ratón muestran que el 60-70% de los espermatozoides transportan el transgén cuando se les inyecta ADN en los conductos deferentes (Huguet & Esponda 1998, 2000), y se detectó que el 7.5% de la descendencia contenía el transgén en sus células. Resultados similares se han publicado usando liposomas que contenían el transgén, inyectándolos cerca del epidídimo (Sato *et al.* 1999a, 1999b, 2000). Yonezawa *et al.* (2001) utilizaron la técnica de TMGT con diferentes tipos de liposomas obteniendo más de un 80% de embriones de ratón que expresaban la EGFP.

La **inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)** se presenta como una técnica que permitiría incrementar la eficiencia de la SMGT mediante la inyección de espermatozoides unidos con ADN (*ver apartado 1.5.5*). Mediante este método de fecundación *in vitro* se soluciona el problema asociado a la muerte espermática, que resulta de los diferentes tratamientos espermáticos que ayudan al ADN exógeno a cruzar la barrera natural del espermatozoide. Así se podrían utilizar espermatozoides tratados con Tritón X-100, espermatozoides sometidos a ciclos repetidos de congelación-descongelación o congelación-deseccación antes de la incubación con ADN exógeno. El éxito limitado de la ICSI en algunas especies ha impedido la aplicación de esta técnica. Se ha obtenido descendencia mediante ICSI-SMGT en diferentes especies además de ratones,

como son ratas (Kato *et al.* 2004; Hirabayashi *et al.* 2005), cerdos (Lai *et al.* 2001) y en mono *Rhesus* (Chan *et al.* 2000a, 2000b).

Otra novedad en la SMGT es el uso de anticuerpos que sirven de enlaces. Chang *et al.* (2002) emplearon **anticuerpos monoclonales** de superficie específicos para espermatozoides, sirviendo estos anticuerpos como moléculas de unión para el ADN en la superficie de los espermatozoides de ratón y de cerdo. Tras la fecundación con este tipo de espermatozoides tratados con anticuerpos el transgén fue detectado en el genoma de la descendencia tanto en ratones como en cerdos. La transmisión a la F₁ ocurrió con una eficiencia de un 37.5% en cerdos y un 33% en ratones, la transmisión a la F₂ sólo pudo ser obtenida en cerdos.

Diversos grupos han empleado otros tratamientos como la **electroporación** o el uso de **liposomas** para facilitar la unión del ADN a los espermatozoides (Smith & Spadafora 2005). La electroporación es un procedimiento que unido a la técnica de SMGT, permite aumentar el número de moléculas de ADN que captan los espermatozoides (Rieth *et al.* 2000). Estos autores concluyen que la electroporación solo se debería llevar a cabo en aquellas especies donde el proceso de SMGT no sea eficiente, ya que de esta manera disminuye el estrés a nivel espermático. Tsai *et al.* (1997) usan la electroporación de los espermatozoides del molusco *Haliotis Divorsicolor Supertexta*, para facilitar la unión del ADN a los espermatozoides. Se demostró que el transgén fue transmitido a la primera generación en un 65% de los casos e integrado en el genoma de algunas larvas. Müller *et al.* (1992) usaron este método en peces dando lugar a un 3-4% de expresión del transgén. Patil & Khoo (1996), también utilizan esta técnica en el pez cebra, y muestran que las células espermáticas electroporadas captan un mayor número de moléculas de ADN que aquellas células no sometidas a la electricidad, pero esta técnica no incrementa el número de espermatozoides que unen el ADN. La electroporación se ha visto que afecta a la motilidad espermática pero no al proceso de fecundación. Horan *et al.* (1992a) usa la electroporación en cerdos, y obtienen que un 70% de espermatozoides móviles incorporan el plásmido. La cantidad de ADN unido al espermatozoide solo se incrementaba en un 5-10% cuando utilizaban estos tratamientos. Rieth *et al.* (2000) obtuvieron un 46.5% de embriones transgénicos de cabra utilizando espermatozoides electroporados, frente a un 3.5% en ausencia de la técnica.

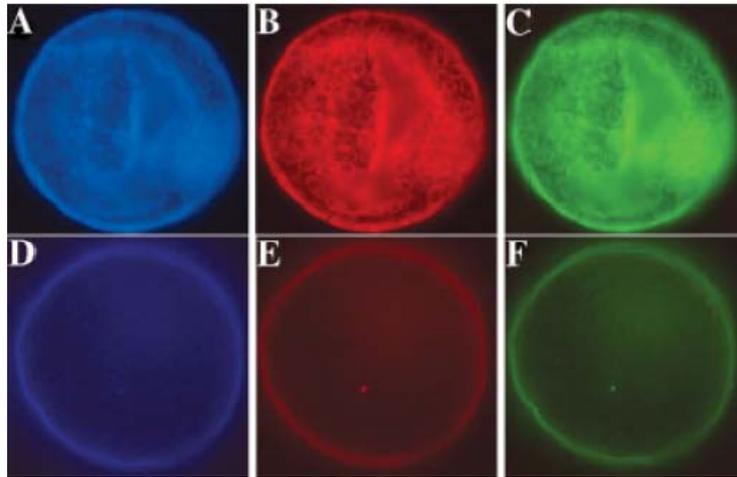
También se han utilizado liposomas (*Ver apartado 1.4.4*) en conejos mediante FIV obteniendo animales transgénicos en su progenie (Wang *et al.* 2001) y en ratas (Yonezawa *et al.* 2002) que dieron lugar a animales viables, o el uso de protaminas (Alderson *et al.* 2006) en la SMGT, como protección del ADN exógeno contra la acción de posibles enzimas.

Los esfuerzos van dirigidos a la mejora en la integración del transgén en el genoma hospedador. En 1996, Kroll & Amaya introducen un plásmido lineal en el núcleo de espermatozoides de *Xenopus* usando **enzimas de restricción (REMI)** para descondensar el ADN genómico. El 36% de la descendencia obtenida fueron transgénicos por esta técnica, comparada con un 19% cuando no se utilizó esta enzima. Shemesh *et al.* (2000) emplean estas mismas enzimas para integrar los transgenes en el genoma de espermatozoides de toro, combinada con la lipofección, consiguiendo resultados alentadores en la producción de transgénicos, obteniendo un 30% de las mórulas con expresión de GFP.

Shen *et al.* (2006) producen de una forma simple y eficiente ratones y conejos transgénicos usando **dimetil-sulfóxido (DMSO)** como medio para transferir células espermáticas con ADN lineal y circular, mediante la inyección directa en el testículo del animal con una eficiencia de un 28.6% en ratón y un 56.3% en conejo, mostrándose como una alternativa a la electroporación y al uso de lípidos, siendo más económico y no dañando a los espermatozoides *in vivo*.

Es necesario un método eficaz y simple para la producción de **animales multitransgénicos** necesarios para aplicaciones en las áreas de veterinaria y medicina. El grupo de Lavitrano hizo uso de la SMGT para producir con alta eficiencia cerdos multitransgénicos usando 3 genes que codifican 3 proteínas fluorescentes: EBFP, EGFP y DsRed2 (Webster *et al.* 2005). Estas 3 proteínas fluorescentes fueron expresadas en 171 de 195 embriones en estadio de mórula/blastocisto observados 6 días tras la inseminación (88%). De 18 lechones nacidos, todos eran transgénicos para al menos un gen, 7 de ellos eran triple-transgénicos, 7 de 18 eran dobles, y cuatro eran transgénicos para un solo gen. El ARN y la expresión de la proteína fueron encontrados en músculo, corazón, hígado, pelo y en células mononucleares sanguíneas. Estos resultados indican que la técnica de SMGT es adecuada para introducir varios genes en el cerdo.

FIGURA 26. Expresión de las proteínas fluorescentes con filtro azul (EBFP), filtro rojo (DsRed2) y filtro verde (EGFP) en un blastocisto de 6 días (paneles A, B, C). No hubo expresión en los controles negativos (paneles D, E, F) (Webster *et al.* 2005).



1.9 ESTRUCTURA DE UN TRANSGÉN. PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE: GFP

Los transgenes constan esencialmente de dos componentes: el gen estructural, que queremos estudiar, y los llamados elementos reguladores. El primero será el portador de la información genética necesaria para la síntesis de la proteína que queremos analizar. Entre los genes más usados en transgénesis podemos citar: *LacZ* (β -galactosidasa), *GusA* (β -glucuronidasa), *Cat* (cloramfenicol acetiltransferasa), *SEAP* (secreted alkaline phosphatase), *Luc* (firefly luciferasa), *GFP* (Green Fluorescent Protein) y proteínas relacionadas. Los elementos reguladores (promotores, secuencias activadoras, etc.) son las secuencias de ADN responsables de que nuestro gen se exprese en un determinado tipo celular y/o momento del desarrollo. Este concepto es importante ya que podemos dirigir la sobreexpresión del transgén hacia los tejidos de nuestro interés. Los más usados son de origen viral (*citomegalovirus-CMV*, *simian virus 40-SV40*) que producen un alto grado de expresión, pero existen otros promotores más específicos que hacen que el gen solamente se exprese en lugares muy concretos del organismo. Por ejemplo, si utilizamos el promotor de la queratina tendremos expresión del transgén únicamente en la epidermis. Sin embargo, se pueden incorporar promotores que se expresen en todos los tejidos, como sucede con el promotor del gen metalotionina y el promotor de la actina del pollo. También es recomendable incorporar a la

construcción transgénica un gen que nos permita analizar fácilmente la expresión. Uno de los más empleados es el gen *LacZ*, que codifica para la enzima bacteriana β -galactosidasa, ya que permite la detección rápida y sensible de la expresión del transgén por medio de la coloraciones de embriones enteros o tejidos lo que nos indicará cuales son los animales transgénicos, e incluso cuales son los tejidos y el momento preciso del desarrollo donde se expresa el transgén. Y por último, otro elemento regulador a tener en cuenta, es la cola de poli A, que marca el final de la transcripción y sirve para proporcionar al ARNm de una secuencia que lo estabiliza con mayor o menor eficacia (Benavides & Guénet 2003).

1.9.1 HISTORIA DE LA GFP

Las proteínas fluorescentes de invertebrados marinos han revolucionado la vida científica. Organismos procedentes de todos los reinos han sido transformados con la proteína verde fluorescente (GFP) procedente de *Aequorea Victoria*, produciéndose un gran avance en la biotecnología debido al uso de estas proteínas. El número de artículos científicos de proteínas fluorescentes en organismos transgénicos está creciendo exponencialmente: 200 artículos fueron publicados entre 1994 y 2001, mientras que entre 2001 y 2004, fueron más de 900. Más de las 3/4 partes de estas publicaciones recientes usaron *A. Victoria* GFP y sus variantes (Stewart 2006). Por ejemplo, el mono *Rhesus* "ANDI" fue el primer primate transgénico para la GFP, aunque esta proteína ha sido utilizada en múltiples especies.

La proteína verde fluorescente fue descubierta por *Shimomura et al.* en 1962. Esta proteína está involucrada en la bioluminiscencia que emiten diversos géneros de metazoos, en el que se incluyen las medusas, anémonas de mar y corales. El papel biológico de esta bioluminiscencia no está claro, aunque parece indicar que cuando estos metazoos se sienten amenazados emiten esta luminiscencia para ahuyentar al predador. *Prasher* (1995) describió que la emisión de la luz verde es producida a partir de la energía liberada por las luciferasas o fotoproteínas. En 1992, *Prasher et al.* clonaron el gen de la GFP a partir de la medusa *Aequorea Victoria* (Figura 27). La vía de emisión de bioluminiscencia de esta medusa en particular, es



FIGURA 27. Imagen de la medusa *Aequorea Victoria*.

El papel biológico de esta bioluminiscencia no está claro, aunque parece indicar que cuando estos metazoos se sienten amenazados emiten esta luminiscencia para ahuyentar al predador. *Prasher* (1995) describió que la emisión de la luz verde es producida a partir de la energía liberada por las luciferasas o fotoproteínas. En 1992, *Prasher et al.* clonaron el gen de la GFP a partir de la medusa *Aequorea Victoria* (Figura 27). La vía de emisión de bioluminiscencia de esta medusa en particular, es

producida por la fotoproteína *aequorina* unida a la luciferina coelenteramida en contacto con el Ca^{2+} que provoca la oxidación de la luciferina. La energía liberada en esta oxidación es transferida a la GFP y estimula la producción de luz verde *in vivo* (Prasher 1995).

Chalfie et al. (1994) consiguen que el ADN de esta proteína se exprese en células tanto procariotas (*Escherichia Coli*) como eucariotas (*Caenorhabditis Elegans*). A partir de este experimento se demostró que la expresión de la GFP podría ser utilizada para monitorizar la expresión de genes y la localización de proteínas en organismos vivos. Más tarde, se crearon otros animales y plantas transgénicas, como *Drosophila Melanogaster* (Wang & Hazelrigg 1994) y el pez cebra (Amsterdam *et al.* 1995; Peters *et al.* 1995), utilizando la GFP. En 1995, *Ikawa et al.* insertan la GFP en ratones para demostrar que la inserción de este gen era factible y se podían producir diferentes líneas de ratones transgénicos.

1.9.2. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE GFP

La característica más importante de la GFP es la presencia de un cromóforo altamente fluorescente formado por el tripéptido cíclico Ser-Tyr-Gly. Para producir la emisión de fluorescencia, es necesario que la proteína GFP adopte unos plegamientos formando un cilindro, quedando el cromóforo en el interior de esta estructura (Ormo *et al.* 1996).

La GFP es una proteína estable (Ormo *et al.* 1996). Pero cuando la proteína se desnaturaliza pierde la fluorescencia (Prasher 1995; Tsien 1998). Por ejemplo, la desnaturalización a altas temperaturas (a partir de 78°C), provoca la pérdida del 50% de la fluorescencia. La GFP tiene numerosas propiedades como son la neutralidad, la no toxicidad, y su uso como marcador universal cuando se expresa en organismos transgénicos. A niveles fisiológicos relevantes, GFP es completamente digerida y no presenta ningunas características de tipo alergénico (Stewart 2006).

1.9.3. APLICACIONES DE LA GFP

Las utilidades que presenta la GFP son numerosas, entre éstas podemos destacar las siguientes:

- Puede ser detectada por un microscopio convencional de fluorescencia
- A diferencia de otras moléculas no necesita de cofactores o substratos para ser detectada
- Su peso molecular es relativamente bajo (27 KDa), lo que facilitaría su difusión a través de células ramificadas tales como neuronas o células de Glía
- Tiene la capacidad de unirse a proteínas y marcarlas
- Puede dar lugar a diferentes colores por cambios en sus aminoácidos
- La fluorescencia resiste a tratamientos con formaldehído lo que nos permite trabajar con preparaciones fijadas. Pero soluciones fijadoras muy ácidas o el uso de disolventes orgánicos pueden desnaturalizar la proteína y eliminar la fluorescencia

La variante mutada verde EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") es la forma mutada más utilizada (Furtado & Henry 2002; Nakanishi *et al.* 2002; Kusser & Randall 2003). Esta variante tiene una intensidad de fluorescencia 20 a 35 veces superior respecto del tipo salvaje de GFP (Hadjantonakis *et al.* 2001). En 1997, Okabe *et al.* producen las primeras líneas transgénicas de ratones que expresaban el transgén EGFP. Algunas otras variantes de la GFP salvaje son la EYFP ("Enhanced Yellow Fluorescent Protein"), la EBFP ("Enhanced Blue Fluorescent Protein") y la ECFP ("Enhanced Cyan Fluorescent Protein"), todas ellas producidas por diferentes sustituciones aminoacídicas que provocan una alteración de los perfiles espectrales respecto de la GFP salvaje (Hadjantonakis & Nagy 2001).

También se utiliza el gen de la GFP unido a rodamina o fluoresceína, lo que nos permite discernir la unión del ADN al espermatozoide mediante simple microscopía de fluorescencia o microscopía confocal (Tsien 1998). El plásmido de ADN incluye GFP y rodamina unida bajo el control del promotor citomegalovirus (CMV). El CMV se usa como promotor en la mayoría de estudios de transgénesis. El uso de la GFP es una herramienta poderosa para determinar con éxito el ADN exógeno en los ovocitos y embriones. Aunque se requiere el microscopio de fluorescencia, se ha visto que el éxito de la producción de ratones transgénicos (Takada *et al.* 1997; Perry *et al.* 1999) usando GFP pone en evidencia un efecto muy limitado o ningún efecto en el desarrollo embrionario y fetal (Chan *et al.* 2000a, 2000b). La utilidad de un marcador fluorescente (rodamina) para el ADN es incalculable. Esto permite obtener imágenes de la dinámica del ADN durante

FIV e ICSI. La rodamina es elegida por diferentes razones: su excitación con luz roja, la longitud de onda (menos dañino, menos energía), y evitar confusión con una posible expresión anticipada de la GFP (Chan *et al.* 2000a). La detección directa de la fluorescencia de GFP no es el indicador más sensible de la expresión. Hay embriones en la que no fue detectada su expresión por fluorescencia directa, sin embargo los embriones se fijaron y lavaron con anticuerpos anti-GFP y se detectó la expresión (Chan *et al.* 2000a).

El ADN de la GFP se ha utilizado en diferentes áreas de la investigación biológica. Entre las aplicaciones más importantes se encuentran la monitorización de la expresión génica *in vivo* y el marcaje y localización de proteínas. Para la monitorización de la expresión génica *in vivo* se utiliza el gen de la GFP bajo el control de algún promotor de interés, y directamente indica el nivel de expresión del gen en células vivas o en tejidos (Ventela *et al.* 2000; Izzo *et al.* 2001). El marcaje y localización de proteínas de fusión entre un gen de interés el cual será introducido al organismo. La proteína resultante, que contendría la GFP unida, podría estudiarse utilizando un microscopio de fluorescencia (He *et al.* 2000).

También se utiliza la GFP para monitorizar células vivas (Kawakami *et al.* 1999a, 1999b). Tiene especial importancia en la selección de células madre embrionarias (Ohta *et al.* 2000; Hanson *et al.* 2003) y en la selección de embriones transgénicos preimplantacionales (Kato *et al.* 1999). La GFP también ha sido utilizada por muchos autores para marcar células específicas en organismos multicelulares, ejemplos de ello son: los conos fotorreceptores en ratón (Fei & Hughes 2001), células madre derivadas de la médula ósea (Ito *et al.* 2001), migración de células hematopoyéticas inmaduras al parénquima cerebral de ratón (Ono *et al.* 1999), neuronas en *Drosophila* (Tyrrer *et al.* 2000) y células de Purkinje en ratón (Zhang *et al.* 2001).

Finalmente, la GFP ha sido también descrita como indicador no invasivo del pH de forma intrínseca utilizando animales transgénicos que expresan EGFP en el lugar de nuestro interés, por ejemplo intraacrosomal (Nakanishi *et al.* 2001). Otros autores la han utilizado para monitorizar el Ca^{2+} intracelular a partir de un indicador proteico fluorescente de una de las variantes de GFP (Romoser *et al.* 1997).

1.9.4. DETECCIÓN DE LA GFP

La GFP de *Aequorea* tiene dos picos de excitación, para la absorción de luz azul entre 395-470 nm, y un espectro de emisión de luz verde de una longitud de onda máxima de 509 nm.

La detección de la GFP depende de muchos factores (Tsien 1998). Obviamente cuantas más copias del gen y cuanto más potentes sean los promotores que dirigen la transcripción, la célula sintetizará más GFP. Pero hay otros factores que afectan a la detección. En primer lugar, cabe considerar la eficiencia en la formación del fluorocromo postranscripcional, que depende de la solubilidad, temperatura, oxígeno, oxidaciones, etc. Otro factor a tener en cuenta son las propiedades moleculares de la GFP, que dependen de: la longitud de onda de excitación y emisión, dimerización, susceptibilidad a la fotoisomerización, etc.

Respecto a la histología y la fijación de los tejidos, la fluorescencia de la GFP no se ve afectada si fijamos los tejidos con glutaraldehído ni formaldehído, pero soluciones fijadoras muy ácidas o disolventes orgánicos pueden desnaturalizar la proteína y eliminar la fluorescencia (Llombart 2003).

Finalmente, hay que tener en cuenta la autofluorescencia de las células o del medio de cultivo a la misma longitud de onda, la localización de la GFP (difusa vs. localizada en pequeñas subregiones de las células o tejidos), la calidad de los filtros de excitación y de emisión, la sensibilidad de las fuentes del fotodetector, etc. (Llombart 2003).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Una vez realizado el análisis y estudio del estado actual de la transgénesis mediada por espermatozoides, nos planteamos como **objetivo general** de esta Tesis Doctoral contribuir al desarrollo de un método eficiente de producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos y lechones *in vivo* aprovechando la capacidad de transferencia de ADN exógeno que presenta el espermatozoide; este objetivo se complementa con un estudio detallado de la interacción entre espermatozoides y ADN. Para este trabajo nos planteamos las siguientes **tres hipótesis**:

1. Profundizar en el conocimiento de los procesos de **unión entre el ADN exógeno y los espermatozoides** podría permitir mejorar, de forma significativa, el rendimiento de la técnica SMGT en la especie porcina.
2. La optimización del proceso de **unión entre ADN exógeno y los espermatozoides** permitiría la **producción eficiente de embriones transgénicos** mediante la técnica de **ICSI y/o FIV**.
3. Con la aplicación del conocimiento generado en las fases previas de este estudio, se podrían **producir lechones transgénicos** de forma eficiente,

mediante el uso de la inseminación artificial (quirúrgica y no quirúrgica), o mediante transferencia de embriones producidos *in vitro*.

Para la aceptación o rechazo de las hipótesis propuestas diseñamos una serie de experiencias que agrupamos en tres grandes bloques con una serie de objetivos específicos que detallaremos a continuación:

1. Evaluación de la capacidad de transferencia de genes exógenos en los espermatozoides porcinos

El estudio de la interacción espermática con el ADN exógeno, bajo diferentes condiciones experimentales y tratamientos espermáticos, es de vital importancia para determinar las mejores condiciones en las que se produce esta unión. Es igualmente prioritario conocer si en los diversos procedimientos se produce una alteración significativa de la funcionalidad espermática, ya que determinará el tipo de técnica de reproducción asistida que podrá ser aplicada posteriormente (inseminación, FIV, ICSI, etc.) para obtener animales transgénicos. Dentro de este bloque de experiencias se plantearon los siguientes objetivos específicos:

(a) Evaluar el efecto de la **presencia del plasma seminal** en la unión ADN-espermatozoide. Debido al efecto inhibitorio que presentan algunos componentes del plasma seminal nuestro objetivo fue comprobar si la presencia de diferentes cantidades de plasma seminal afectaba la unión entre los espermatozoides y el ADN foráneo. Igualmente se analizaron las posibilidades que ofrecía el uso de espermatozoides de origen epididimario que no han entrado en contacto con el plasma seminal.

(b) Estudiar la **cinética de unión** entre los espermatozoides y el ADN, con el objetivo de establecer una curva de unión entre el ADN y los espermatozoides a lo largo del tiempo. De este modo, es posible conocer el tiempo mínimo de incubación de los espermatozoides y el ADN donde se obtiene el mayor porcentaje de unión, previo a su uso en la fecundación *in vitro* o a la aplicación de técnicas de inseminación artificial.

(c) Analizar el efecto del **medio de cultivo** en el que se incuban los espermatozoides con el ADN y que puede modular el grado de capacitación espermática.

(d) Determinar el efecto de diferentes **tratamientos espermáticos** sobre la interacción espermatozoide-ADN. Nuestro objetivo fue comprobar cómo se

afectaba el grado de unión y la viabilidad espermática, cuando se sometían a los espermatozoides a diferentes tratamientos tanto físicos (congelación-descongelación, congelación rápida) como químicos (Tritón X-100, DMSO 0.3% y 3%).

(e) Evaluar la capacidad del espermatozoide para transportar **ADN de diferente tamaño (5.7 y 10.3 Kpb)**.

(f) Comprobar en qué **lugar** se produce la **interacción** entre el transgén y el espermatozoide. Nuestro objetivo en este apartado fue localizar el sitio de unión del ADN exógeno en los espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos espermáticos (intactos, congelación-descongelación, congelación rápida).

2. Producción *in vitro* (FIV, ICSI) de embriones transgénicos

Teniendo evidencia de que los espermatozoides son capaces de actuar como vectores del ADN exógeno, el siguiente paso fue intentar la producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos mediante FIV e ICSI. Los objetivos planteados fueron los siguientes:

(a) El **primer objetivo** en este apartado fue la producción eficiente de embriones transgénicos mediante el uso de la **ICSI**. En las experiencias anteriores se verificaba que el tratamiento espermático afectaba la capacidad de unión al ADN, por lo que nuestra intención fue comprobar que diferentes tratamientos espermáticos (intactos, congelados-descongelados, congelación rápida, Tritón X-100) podrían mejorar la producción de embriones transgénicos. Finalmente se estudió el uso de la recombinasa RecA, como medida de protección del ADN exógeno frente a la actuación de posibles enzimas endógenas, en la producción de embriones transgénicos por medio de técnicas ICSI-SMGT.

(b) El **segundo objetivo** fue la evaluación de la técnica de transgénesis espermática mediante el empleo de sistemas de **FIV**. Debido a la falta de éxito en FIV-SMGT porcina en los numerosos trabajos ya publicados, decidimos utilizar la recombinasa RecA como medida protectora del ADN exógeno frente a la actuación de posibles enzimas endógenas. Por lo que nuestros objetivos específicos para esta experiencia fueron 3: (1) Estudiar cómo se afecta la producción de embriones de FIV por la incubación previa de los espermatozoides con el ADN; (2) Comprobar la eficiencia de la técnica FIV-SMGT en la producción

de embriones transgénicos porcinos; (3) Determinar si el uso de la proteína RecA mejora la eficiencia en el desarrollo embrionario y en la expresión del transgén.

3. Producción *in vivo* de embriones y lechones transgénicos

Con la experiencia del trabajo desarrollado en los apartados anteriores se diseñaron nuevos estudios para analizar la capacidad de producir animales transgénicos utilizando la técnica SMGT con los objetivos específicos siguientes:

(a) Producción de embriones y lechones mediante el empleo de la **inseminación artificial intrauterina** tanto por vía cervical (mediante el uso de catéteres de inseminación profunda) como por laparotomía. Se realizaron inseminaciones intrauterinas con el objetivo de depositar un número reducido de espermatozoides cerca del lugar de fecundación para poder minimizar la posible competencia que pudiera existir entre los espermatozoides unidos al transgén y los no unidos.

(b) Una vez confirmado que el ADN exógeno, en nuestras condiciones experimentales, se une en su mayoría a espermatozoides no viables (solo un % muy bajo a células vivas), decidimos utilizar la ICSI y la **transferencia de embriones** como una alternativa para poder obtener lechones modificados genéticamente.

Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina

Revisión bibliográfica

Hipótesis de trabajo

Experiencia 1: Estudio de la interacción transgén-espermatozoide

Experiencia 2: Producción *in vitro* de embriones transgénicos (FIV, ICSI)

Experiencia 3: Producción *in vivo* de embriones y lechones transgénicos (IA, transferencia embriones)

Análisis de los resultados

Confirmación o negación de hipótesis



MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de esta Tesis se realizó bajo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Murcia, cumpliendo con lo establecido en la legislación de experimentación animal y organismos modificados genéticamente (OMG) según la LEY 9/2003. En este apartado se describirá la metodología seguida en el presente trabajo refiriendo simultáneamente el material utilizado. Salvo que se indique lo contrario todos los reactivos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

3.1 VALORACIÓN ESPERMÁTICA

3.1.1 ANIMALES

El semen utilizado procedió de verracos de fertilidad probada pertenecientes al centro de inseminación artificial de la granja "Lo Navarro" S.A. (Murcia, España). Los animales estuvieron alojados en habitáculos individuales mantenidos a temperatura controlada (25°C) y bajo condiciones naturales de luz y humedad. Los programas sanitarios y nutricionales, aplicados a los verracos, fueron los utilizados sistemáticamente por la explotación.

3.1.2 MEDIO UTILIZADO PARA EL PROCESADO ESPERMÁTICO

El medio utilizado para la dilución y lavado de los espermatozoides fue el *Swine Fertilisation Medium* (SFM) descrito previamente por *Lavitrano et al.* (2002), (Tabla 13). Este medio fue posteriormente suplementado con 6 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA). El pH final del medio fue ajustado a 6.8.

TABLA 13. Diluyente SFM/BSA para procesamiento de espermatozoides de verraco.

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	11.25
Citrato Sódico•2H ₂ O	10
EDTA	4.7
Ácido cítrico•H ₂ O	3.25
Trizma	6.5

3.1.3 CONSTRUCCIÓN Y MARCADO DEL ADN (Rodamina/Fluoresceína/Digoxigenina)

La proteína verde fluorescente GFP (*Figura 28*) es una proteína que proviene de *Aequorea Victoria* que da lugar a fluorescencia verde cuando es expuesta a luz azul. La variante mutada verde EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) es la forma mutada más utilizada (Furtado & Henry 2002; Nakanishi *et al.* 2002; Kuser & Randall 2003). Esta variante tiene una intensidad de fluorescencia de 20 a 35 veces superior respecto del tipo salvaje de GFP (Hadjantonakis *et al.* 2001), y es la que hemos utilizado para todos nuestros experimentos.

La construcción del gen que codifica la EGFP se detalla a continuación: El plásmido pEGFP-N1 que contiene el promotor temprano CMV (citomegalovirus) humano y el gen EGFP fue obtenido de *Clontech* (pEGFP-N1, 5.7 Kpb, Clontech

Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, EE.UU). El *polylinker* pEGFP-N1 fue eliminado y un adaptador *Bcl* I-*Hind* III fue insertado en el sitio Afl III.

Para la obtención del plásmido de 10.3 Kpb, en primer lugar se creó el plásmido MAR-CMV, donde las regiones del accesorio de la matriz (MAR: 2.3 Kpb), que eran los elementos del gen humano de β -interferón, fueron subclonadas en el adaptador antes del promotor CMV. Tres elementos Kb *Bcl* II-*Hind* III MAR aislados del gen humano β -interferón fueron subclonadas dentro del adaptador *Bcl* I. Finalmente, se coloca otro elemento MAR después del transgén. Para hacer la construcción se utilizó un adaptador BanHI-EcoRI que se insertó en el sitio StuI del plásmido MAR-CMV-EGFP. El elemento MAR humano de β -interferón fue subclonado en el adaptador formando un plásmido MAR-CMV-EGFP-MAR (*Figura 29*). El elemento de MAR fue cedido amablemente por M. Kalos (Centro de Investigación de Cáncer de Fred Hutchinson, Washington, EE.UU).

El plásmido lineal fue marcado con fluoresceína-12-dUTP (*Roche*[®], Alemania), o con digoxigenina-11-dUTP (*Roche*[®], Alemania), o con rodamina-11-dUTP (*Proligo*[®], Francia). El marcado de ADN se realizó mediante *random primer*. Este proceso se desarrolló como se explica brevemente en los siguientes pasos: primeramente, el ADN molde (plásmido linealizado) se desnaturalizó mediante la aplicación de 95°C durante 5 min, posteriormente se añadieron los nucleótidos (1 mM de dATP, dCTP y dGTP, 0,65 mM de dTTP y 0.35 mM del nucleótido marcado), 5x buffer y 1U/ μ l Klenow. Posteriormente, la mezcla se incubó 1 h a 37°C, la reacción se detiene añadiendo 2 μ l de 0.2 M EDTA (pH 8). El ADN marcado se precipita con etanol frío y finalmente se resuspende en agua. La comprobación del marcaje del plásmido se determinó en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La incorporación del nucleótido marcado en el ADN sintetizado disminuye su movilidad electroforética con respecto al ADN no marcado (Gutiérrez-Adán & Pintado 2000).

El procesado y marcado del ADN fue realizado en el laboratorio de "Embriología molecular y biogeneración" dirigido por el Dr. *Gutiérrez Adán* del Departamento de Reproducción Animal del INIA en Madrid.

FIGURA 28. Estructura GFP. (a) Partes estructurales que componen el plásmido GFP; (b) Diagrama de la estructura cristalina del gen GFP.

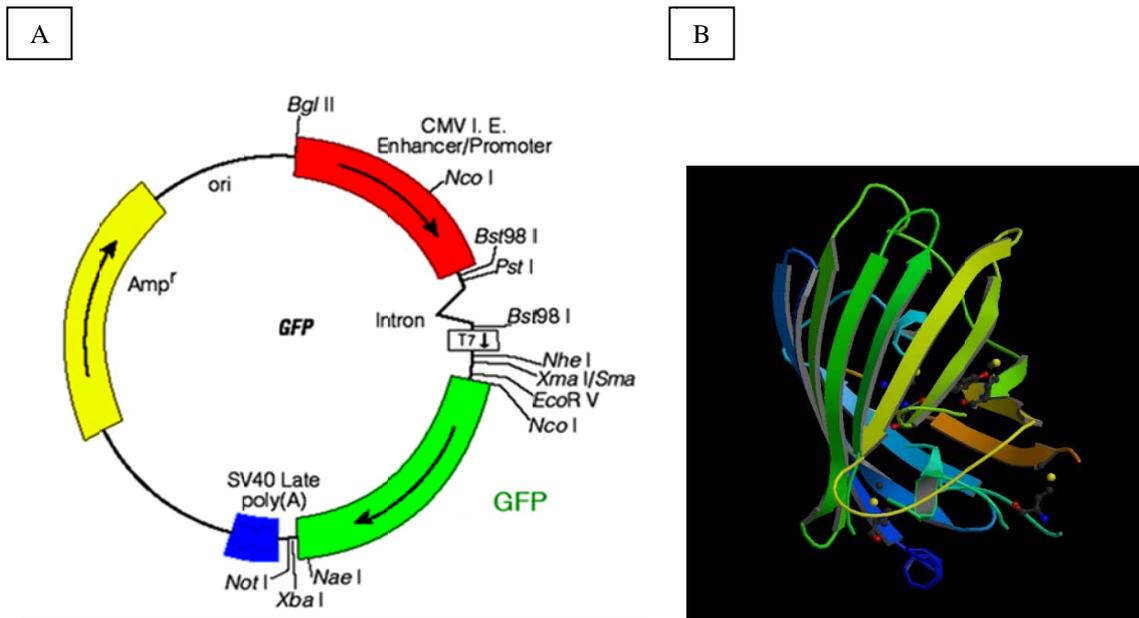
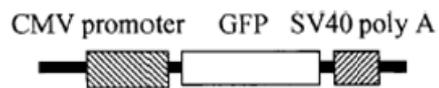


FIGURA 29. Estructura de la EGFP. Diferentes tamaños del plásmido: (a) EGFP: 5.7 Kpb; (b) MAR+EGFP: 8 Kpb; (c) MAR+EGFP+MAR: 10.3 Kpb.

a) Estructura de EGFP (tamaño del plásmido de 5.7 Kpb)



b) Estructura de EGFP más una secuencia MAR (tamaño del plásmido de 8 Kpb)



c) Estructura de EGFP más dos secuencias MAR (tamaño 10.3 Kpb)



3.1.4 RECOGIDA DEL SEMEN

3.1.4.1 Recogida de espermatozoides eyaculados

La recogida de semen se realizó mediante el método manual (King & Macpherson 1973). La primera fracción del eyaculado (concentración baja de espermatozoides) fue eliminada, y la fracción rica en espermatozoides fue recogida en un termo estéril precalentado a 37°C (para evitar el choque térmico) y filtrada mediante gases estériles para descartar las secreciones de la glándula de *Cowper*. Inmediatamente tras la recolección del eyaculado, el semen fue diluido 1:1 en medio SFM (*Swine Fertilisation Medium*) sin BSA, precalentado a 37°C.

3.1.4.2 Recogida de espermatozoides de epidídimo

Los epidídimos utilizados procedían de verracos sanos sacrificados en matadero. El transporte al laboratorio se realizó en un recipiente isoterma en un plazo máximo de 1 h tras el sacrificio. Una vez en el laboratorio, los testículos fueron lavados con solución salina atemperada procediéndose tras ello, a la disección de la cola del epidídimo. Posteriormente, se lavó el conducto con 2 ml de medio BTS utilizando una aguja de 21 G acoplada a una jeringuilla de 5 ml. Las muestras resultantes del lavado fueron analizadas y solamente se utilizaron aquellas en las que la población espermática mantenía su integridad de membrana en un número superior al 80%.

3.1.5 VALORACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

3.1.5.1 Evaluación inicial de la calidad seminal

La calidad del semen fue evaluada inicialmente en la propia granja, valorando el volumen del eyaculado, la concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles y motilidad progresiva, y formas anormales.

El volumen del eyaculado se midió en una probeta graduada. La concentración espermática fue analizada mediante el uso de un

espectrofotómetro (*SpermaCue*, Minitüb®, Tiefenbach, Alemania) calibrado para su uso en la especie porcina. La *motilidad* se evaluó mediante la observación en microscopio de campo claro con objetivo 10X, depositando 10 µl de la muestra sobre un portaobjetos precalentado en una placa térmica atemperada a 38°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido en una escala de 0 a 5. Para el estudio de la *morfología*, una vez en el laboratorio, se fijó una muestra de semen en solución salina formolada al 0.3%, y se valoró en un microscopio de contraste de fases (*Leica*® modelo DMR) con objetivo de inmersión (100X), clasificando los espermatozoides en: normales, colas en látigo, colas en ovillo, gotas citoplasmáticas proximales y distales, y otras formas anormales.

Sólo se utilizaron aquellos eyaculados que superaban los parámetros de calidad que se indican en la *tabla 14*.

TABLA 14. Características seminales de los eyaculados de los verracos utilizados para las diferentes experiencias.

Volumen	≥75 ml
Número total de espermatozoides por eyaculado	≥2x10¹⁰
Motilidad	≥70%
Motilidad progresiva	≥3
Anormalidades morfológicas	≤25%

3.1.5.2 Evaluación de la integridad de membrana

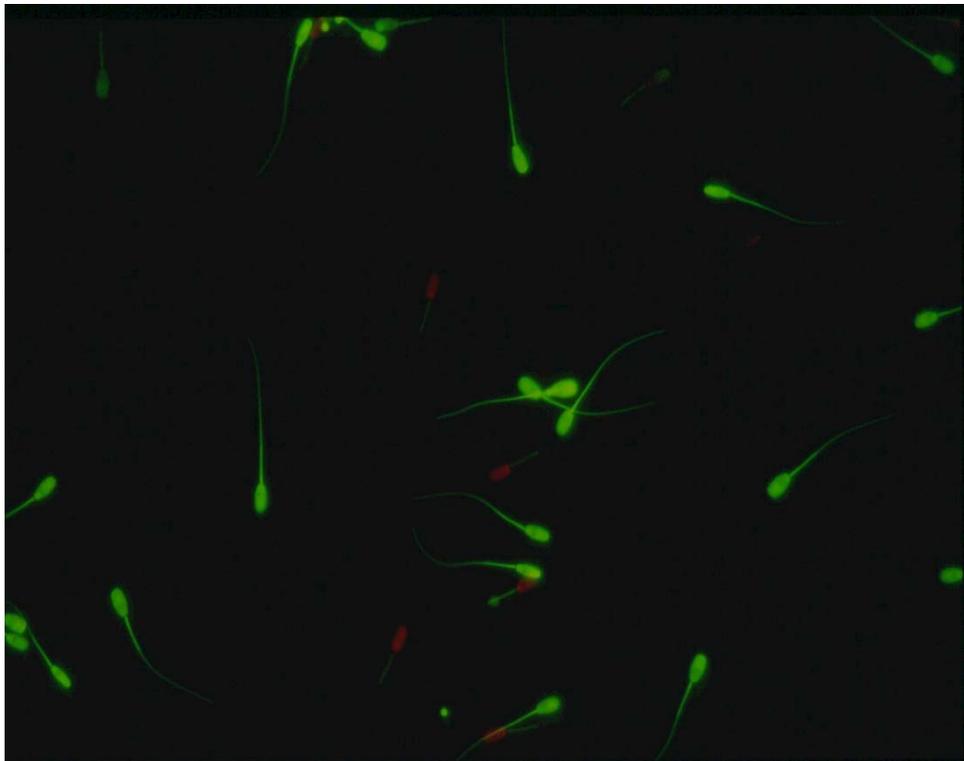
La integridad de membrana se valoró incubando los espermatozoides en una solución que contenía 20 µl de la solución stock de Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) [0.46 mg/ml DCF en Dimetil-Sulfóxido (DMSO)], a la cual se le añadió 20 µl de solución de Ioduro de Propidio (IP) [IP en solución salina fisiológica (SSF) 500 µg/ml], 10 µl de SS formolada, 100 µl de la muestra de semen y 900 µl de SSF (Harrison & Vickers 1990).

Esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 10 min en un lugar protegido de la luz. Pasado este tiempo se colocaron 10 µl de la solución

final en un portaobjetos y bajo un cubreobjetos. Finalmente, se valoró mediante microscopía de fluorescencia (*Leica*[®] modelo DMLS) con un filtro de excitación a 580 nm bajo objetivo de inmersión (100X).

Clasificamos los espermatozoides observados en dos grupos: 1) Células con fluorescencia verde ■: Integridad de membrana intacta; 2) Células con fluorescencia roja ■: Integridad de membrana alterada. Ver *figura 30*.

FIGURA 30. Valoración de la integridad de membrana espermática. Espermatozoides teñidos con fluorocromos DCF/IP. Imagen de fluorescencia (40X).



3.1.5.3 Evaluación del desorden lipídico en la membrana plasmática

Para detectar el desorden lipídico en la membrana plasmática y la viabilidad celular, la muestra de semen fue teñida con Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro 1 (Harrison *et al.* 1996). Las soluciones stock de M540 (1 mM) y Yo-Pro 1 (25 μ M, Molecular Probes, Eugene, OR) fueron preparadas en DMSO. Por cada ml de semen diluido (contiene $5-10 \times 10^6$ espermatozoides), se añadió 2.7 μ l de la

solución de M540 (una concentración final de 2.7 μM) y 1 μl de Yo-Pro (concentración final de 25 nM). La fluorescencia de M540 fue recogida por el sensor FL2 del citómetro de flujo *Coulter Epics XL* (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA), usando una longitud de onda de 575 nm y Yo-Pro 1 con el sensor FL1 usando 525 nm de longitud de onda. Las células fueron clasificadas en 3 categorías: 1) Viables y bajo desorden lipídico (Baja fluorescencia de Merocianina), 2) Viables y alto desorden lipídico (Alta fluorescencia de Merocianina) o 3) Muertos (Fluorescencia para Yo-Pro 1).

3.1.6 PROCESADO DE ESPERMATOZOIDES E INCUBACIÓN CON ADN

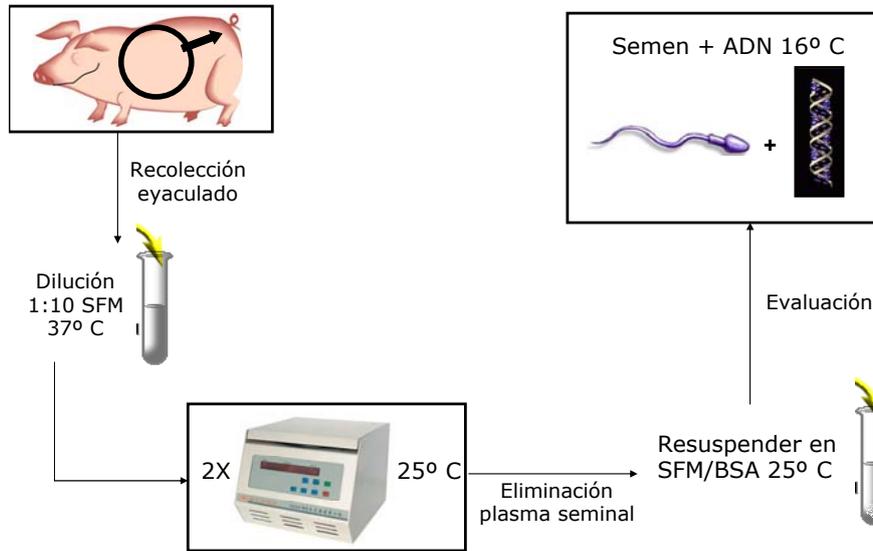
3.1.6.1 Procesado de espermatozoides eyaculados

El semen fue preparado por el método descrito por *Lavitrano et al.* (2002). El procedimiento utilizado fue el que se describe a continuación. Tras la recogida de la fracción rica del eyaculado y la dilución del semen 1:1 en medio SFM sin BSA, fue trasladado al laboratorio en un termo eléctrico a 37°C. Una vez en el laboratorio, se diluyó de nuevo en medio SFM (37°C) en una proporción de 1:10 (5 ml semen 1:1 + 45 ml medio) en tubos *Falcon*[®], y se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C [Centrífuga *Eppendorf 5810R*, Eppendorf Ibérica S.L. (Madrid), Spain].

Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en SFM (en este caso con BSA) a 25°C, de nuevo se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C; se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml del medio con BSA a 25°C. Se evaluó de nuevo la motilidad una vez acabado el procesado de los espermatozoides (debiendo alcanzar para su uso una motilidad superior al 65%, y una motilidad progresiva no inferior a 2.5) y se calculó la concentración final mediante el *SpermaCue*[®]. Finalmente, se ajustó la concentración de la suspensión espermática a 10^8 células espermáticas/ml a los que se le añadió 5 μg de ADN exógeno/ml (solución *stock* de ADN 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), siendo ésta la proporción que se utilizará en las diferentes experiencias. En el *esquema 1 y figura 31* se muestra el protocolo utilizado paso por paso.

ESQUEMA 1. Protocolo de procesado de espermatozoides para su uso como vectores de ADN exógeno "SMGT" (*Sperm Mediated Gene Transfer*):

- 1) Recolección de la fracción rica del eyaculado en termo precalentado**
- 2) Dilución inmediata del semen 1:1 con medio SFM (sin BSA) a 37°C**
- 3) Evaluación rápida del eyaculado (volumen, concentración, motilidad, formas anormales)**
- 4) Dilución 1:10 del semen en tubos *Falcon*[®] de 50 ml con el medio (sin BSA) precalentado a 37°C (5ml+45ml)**
- 5) Centrifugación a 800g x 10 min en centrifuga a 25°C**
- 6) Eliminar sobrenadante**
- 7) Resuspender en SFM (con BSA) a 25°C**
- 8) Centrifugación a 800g x 10 min en centrífuga a 25°C**
- 9) Descartar sobrenadante y resuspender en 1 ml del medio con BSA a 25°C**
- 10) Evaluación de la motilidad y concentración**
- 11) Ajustar concentración: 10⁸ espermatozoides/ml + 5µg ADN/ml**
- 12) Coincubar a 16°C los espermatozoides con ADN (plásmido EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*) en 1 ml de volumen final**

FIGURA 31. Resumen esquemático del procesado de espermatozoides para SMGT.

3.1.6.2 Procesado de espermatozoides procedentes de epidídimo

Los espermatozoides procedentes de epidídimo fueron resuspendidos en medio SFM y centrifugados a 800g durante 10 min a 25°C, posteriormente tras descartar el sobrenadante se resuspende en SFM pero en este caso con BSA, centrifugando de nuevo en las mismas condiciones anteriormente descritas. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de SFM con BSA a 25°C. Se calculó la concentración final mediante el *SpermaCue*[®]. Finalmente, se ajustó la concentración de la suspensión espermática a 10⁸ células espermáticas/ml a los que se le añadieron 5 µg de ADN exógeno/ml.

3.1.7 TRATAMIENTOS ESPERMÁTICOS

Los espermatozoides fueron sometidos a diferentes tipos de tratamientos para ser utilizados posteriormente en las distintas experiencias. Los tratamientos llevados a cabo fueron los siguientes:

1) Permeabilización de membranas con el detergente Tritón X-100:

El tratamiento con una solución de Tritón X-100, fue llevado a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por *Perry et al.* (1999). Para ello, se añadieron 100 µl

de Tritón X-100 al 0.5% a 900 µl de la suspensión espermática.

Tras la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, la muestra fue centrifugada dos veces (10.000g durante 3 min). El *pellet* resultante fue recuperado y resuspendido en medio SFM con BSA.

2) Congelación de espermatozoides: Los espermatozoides fueron congelados de acuerdo al protocolo descrito por *Westendorf et al.* (1975), y preservados en nitrógeno líquido en pajuelas de 0.5 ml hasta el momento de su uso. Las pajuelas fueron descongeladas en un baño a 52°C durante 12 seg (*Sellés et al.* 2003), y resuspendidas en SFM (atemperado a 37°C, ratio 1:5). Se lavó la muestra dos veces mediante centrifugación durante 10 min a 800g y 25°C para eliminar el medio de congelación y los restos celulares. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en medio SFM hasta alcanzar la concentración de trabajo (10^8 espermatozoides/ml).

3) Rotura de las membranas por congelación/descongelación rápida: Para provocar la alteración estructural de las membranas espermáticas los espermatozoides fueron sometidos a un proceso rápido y repetido de congelación/descongelación. Para ello, introdujimos una suspensión de espermatozoides en un baño de nitrógeno líquido durante 20 seg, seguido de la inmediata descongelación por inmersión en un baño de agua atemperada a 37°C. Este proceso se repitió 3 veces. Tras el proceso se confirmó que todas las células espermáticas tenían alteraciones graves de la estructura de su membrana mediante la observación microscópica de las muestras teñidas con IP.

4) Tratamiento con Dimetil-Sulfóxido (DMSO): Se siguió el protocolo descrito previamente por *Shen et al.* (2006) y *Li et al.* (2006) en las especies murina y cunícola. Los espermatozoides, una vez procesados, se incubaron en medio SFM suplementado con DMSO hasta alcanzar una concentración final de 0.3 y 3%.

5) Capacitación espermática: Para la capacitación espermática se usó medio TALP (descrito en el *apartado 3.2.3*), el pH final de la solución se ajustó hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO₂, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante 20 h antes de su uso. Los espermatozoides una vez procesados fueron mantenidos en la solución TALP durante 30 min en el incubador (en las mismas condiciones anteriormente descritas), y posteriormente se añadió el transgén, manteniéndose en idénticas condiciones durante su análisis.

6) Recombinasa bacteriana RecA: Preparación de los complejos

RecA: ADN: Los complejos RecA:ADN fueron preparados como describió *Kaneko et al.* (2005). La preparación de la mezcla de ADN + RecA fue iniciada mediante la retirada del 50% del glicerol, en el cual RecA (Epicentro, Madison, WI, EE.UU) fue transportado, por la filtración de gel a través de una columna de Microspin G-25 (Amersham, Poco Chalfong, Reino Unido) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Seguidamente, la columna fue lavada colocando 70 μ l de 1x TKM buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de KCl, 2 mM $MgCl_2$) en el centro de la columna y centrifugada a 735g x 1 min a 4°C. Este paso de la centrifugación fue repetido dos o más veces desechando el 95% del flujo creado. A continuación, 35 μ l de RecA se mezclaron con 35 μ l de 2x TKM buffer, colocado en el centro de la columna y centrifugado durante 2 min a 4°C. El RecA diluido al 50%, libre del glicerol, fue agregado a la mezcla de ADN en un volumen total de 20 μ l en la concentración requerida para satisfacer el ratio 1:40 (ADN:proteína). La concentración final de ADN fue 10 ng/ μ l, manteniendo la proporción 1:40 (ADN:proteína) para cubrir el total de las cadenas de ADN. Para desnaturalizar el ADN y así cubrir la cadena simple de ADN con el RecA, el ADN fue incubado a 95°C durante 5 min en 1x TKM buffer. El ADN desnaturalizado fue enfriado en hielo y posteriormente se agregaron 5 μ g/ μ l RecA para obtener la concentración requerida de la proteína; la mezcla fue incubada en hielo durante 1 h y después mezclada con el semen fresco, en las mismas condiciones anteriormente descritas.

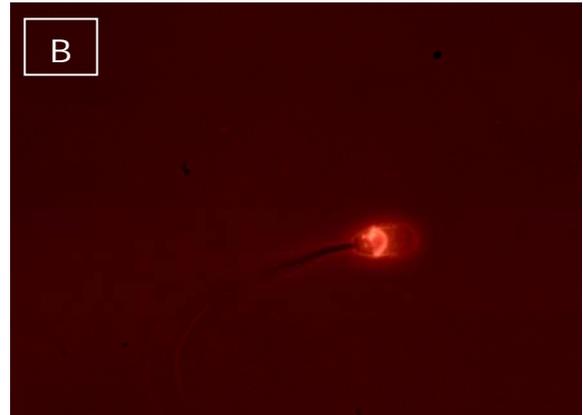
3.1.8 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE ADN Y ESPERMATOZOIDES

3.1.8.1 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN mediante microscopía de fluorescencia

El semen se preparó tal y como se describe en *apartado 3.1.6*, utilizando ADN marcado con rodamina (*apartado 3.1.3*).

Los espermatozoides fueron evaluados a 1000X bajo microscopía de fluorescencia (*Leica*[®] modelo DMLS) con filtro de absorción máxima de 511 nm. Fueron clasificados en: 1) Espermatozoides unidos al ADN (marcados con rodamina-color rojo) (*Figura 32 B y D*); 2) Espermatozoides no unidos al ADN (no marcados con rodamina). Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides.

FIGURA 32. Imágenes de espermatozoides observados con microscopía óptica de contraste de fases (a y c) y de fluorescencia (b y d) (100X). En las imágenes (b) y (d) observamos los espermatozoides unidos al ADN exógeno (EGFP marcado con rodamina, de coloración roja).



3.1.8.2 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN mediante citometría de flujo

El análisis de la unión espermatozoide-ADN fue realizado en el citómetro *Coulter Epics XL* (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida. USA). Los datos medidos por el citómetro fueron analizados usando el programa Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.).

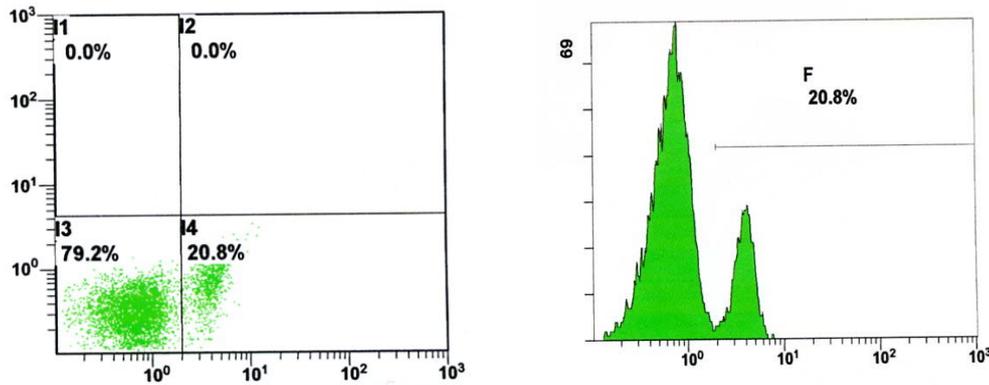
Inicialmente se hizo una selección primaria basada en el tamaño y complejidad de la superficie celular para excluir partículas contaminantes, aglutinaciones, células somáticas, etc. De manera que se seleccionaron sólo las partículas con un tamaño (FSS) y complejidad de la superficie (SCC) compatible con las células espermáticas.

La intensidad de fluorescencia que presentaban los espermatozoides fue analizada mediante el registro de fluorescencia verde (FL1), recogido a través de un filtro de 525 nm, mientras que el registro de fluorescencia roja (FL3) se realizó a través de un filtro de 575 nm.

3.1.8.2.1 Estudio de la cinética de unión entre las células espermáticas y el ADN exógeno

Para estudiar la cinética de unión espermatozoide-ADN, se hicieron mediciones en el citómetro a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min, tomando como tiempo inicial el momento en que se ponían en contacto los espermatozoides procesados (*apartado 3.1.6*) con el ADN marcado con fluoresceína (*apartado 3.1.3*). Se pipetearon 100 µl de la muestra y se añadieron a 3 ml de PBS antes de la medición en cada uno de los tiempos establecidos. En la *figura 33* observamos los gráficos proporcionados por el citómetro para nuestras muestras problema. Vemos claramente dos poblaciones de células bien definidas, en la población de la derecha se encuentra la proporción de espermatozoides unidos al ADN (población con fluorescencia verde).

FIGURA 33. Gráficas de citometría de flujo, donde observamos dos poblaciones espermáticas bien diferenciadas. Los espermatozoides unidos al ADN, marcado con fluoresceína, corresponden a las poblaciones de la derecha.



3.1.8.2.2 Evaluación de la unión entre ADN y espermatozoides, y la viabilidad espermática

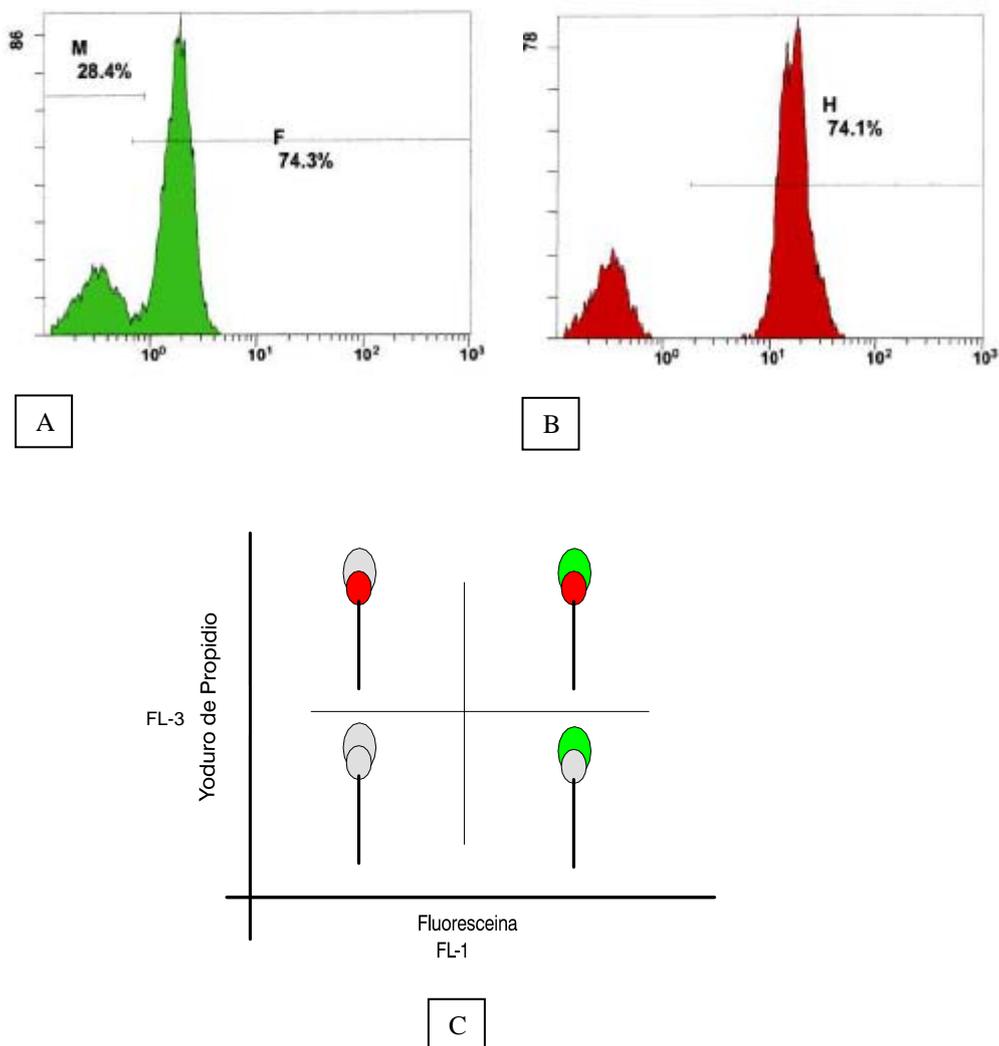
Para realizar diversos estudios de la unión al ADN y simultáneamente la evaluación de la viabilidad celular fue necesario el empleo de dos fluorocromos. Los espermatozoides fueron incubados con ADN marcado con fluoresceína y al mismo tiempo con Ioduro de propidio (9.6 μ l IP de la solución stock 500 μ g/ml, por cada ml de muestra), y posteriormente medidos en el citómetro de la manera descrita anteriormente.

Al utilizar conjuntamente dos fluorocromos es posible distinguir 4 subpoblaciones que describimos a continuación: 1) Espermatozoides vivos sin ADN unido (Ningún signo de fluorescencia) 2) Espermatozoides vivos con ADN unido  (Únicamente fluorescencia verde) 3) Espermatozoides muertos con ADN unido  (Fluorescencia verde y roja) 4) Espermatozoides muertos sin ADN unido  (Fluorescencia roja).

En la *figura 34 A y B* quedan representadas de forma esquemática las subpoblaciones que detectamos cuando medimos las muestras espermáticas con fluoresceína e IP. La población de color verde (*Figura 34A*) de la derecha indica el porcentaje de espermatozoides con ADN unido, y la población de color rojo (*Figura 34B*) de la derecha indica el porcentaje de muerte celular. Al solapar ambas gráficas obtenemos las 4 poblaciones anteriormente mencionadas y que

quedan reflejadas en la *figura 34C*.

FIGURA 34. Gráficas de citometría de flujo cuando utilizamos dos tinciones (roja y verde). En la gráfica (a) la población de la derecha muestra los espermatozoides unidos al ADN marcado con fluoresceína. En la gráfica (b) la población de la derecha son los espermatozoides teñidos con IP (espermatozoides muertos). En la imagen (c) vemos una representación esquemática de las cuatro poblaciones diferentes al utilizar dos fluorocromos distintos.



3.1.8.3 Determinación del lugar de interacción entre el transgén y el espermatozoide

Los espermatozoides fueron procesados e incubados con ADN siguiendo el

protocolo descrito anteriormente (*apartado 3.1.6*). En estos estudios el ADN utilizado había sido marcado previamente con digoxigenina (DIG) (*apartado 3.1.3*). Se utilizaron espermatozoides intactos, otros sometidos a congelación rápida y espermatozoides congelados-descongelados (*apartado 3.1.7*). En este apartado se realizaron distintas experiencias con anticuerpos anti-DIG para evidenciar la presencia del gen mediante el uso de microscopía óptica (ensayo peroxidasa-HRP), de fluorescencia (ensayo Ab-FITC) y electrónica (ensayo con oro coloidal). Los espermatozoides se clasificaron según la localización del ADN: 1) ADN en región acrosomal, 2) ADN en región postacrosomal, 3) ADN en región acrosomal y postacrosomal, 4) ADN no unido.

3.1.8.3.1 Ensayo Ab-peroxidasa (Ab-HRP)

El ensayo con peroxidasa [Horseradish Peroxidase (HRP)] consistió en el uso de un anticuerpo frente al antígeno digoxigenina (DIG) marcado con la enzima HRP (antidigoxigenin-POD, Roche®) que en presencia de un agente oxidante como el peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) genera una señal de coloración marrón. El protocolo seguido fue el que se detalla a continuación:

- 1) Los espermatozoides fueron incubados con el plásmido marcado con DIG siguiendo el procedimiento descrito en *apartado 3.1.3*.
- 2) Transcurrido el período de incubación (24 h) los espermatozoides fueron lavados mediante centrifugación a 300g durante 5 min. De esta forma se eliminó el exceso de plásmido no unido y que podría interferir en los marcajes.
- 3) El precipitado se fijó mediante resuspensión en paraformaldehído al 1% y conservado en la nevera (4°C) hasta el momento de su uso.
- 4) Para el ensayo, los espermatozoides fueron lavados previamente en PBS mediante centrifugación a 300g durante 5 min con el fin de eliminar el fijador del medio. El precipitado se resuspendió finalmente en PBS donde se realizó el ajuste de la concentración final utilizada.
- 5) Con la suspensión resultante se realizaron extensiones con los espermatozoides haciendo uso de portaobjetos.
- 6) Las extensiones, una vez secadas al aire, se lavaron 3 veces durante 5 min en PBS. Para ello, los portaobjetos fueron sumergidos, con ayuda de una gradilla, en una cubeta de cristal.
- 7) Para el bloqueo de la actividad peroxidasa celular endógena, se preparó una solución de 1 ml de H₂O₂ en 100 ml de PBS. Los portaobjetos se mantuvieron durante 30 min en dicha solución.

- 8) Nuevamente se lavó en PBS 3 veces durante 5 min con el fin de eliminar el exceso de H₂O₂ que pudiera quedar en el medio.
- 9) Previamente a la incubación con el anticuerpo se sumergieron los portaobjetos en PBS al 1% de BSA durante 15 min con el fin de evitar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo.
- 10) A continuación, una vez realizado el bloqueo, las muestras se incubaron haciendo uso de una cámara húmeda a temperatura ambiente, con el anticuerpo antiDIG-HRP diluido previamente 1:100 en PBS-1% BSA, durante 1 h.
- 11) Lavamos nuevamente 3 veces durante 5 min.
- 12) Una vez finalizado el tiempo de incubación procedimos al revelado de la HRP mediante el empleo de la siguiente solución:
 - Un vial de Diaminobencidina (DAB) 90 µl
 - 100 ml de PBS
 - 100-200 µl de H₂O₂

Para realizar el revelado las muestras se mantuvieron en la solución de revelado por un periodo de 30 min.

- 13) Una vez finalizado el revelado las muestras se lavaron con agua bidestilada (3 veces durante 5 min).
- 14) Las muestras se dejaron secar al aire previamente a su montaje.
- 15) Finalmente preparamos las muestras para su observación microscópica colocando los cubreobjetos con medio de montaje DPX (BioChemika, Fluka).

La valoración de los espermatozoides se realizó empleando el microscopio óptico de contraste de fases (*Leica*[®] modelo DMLS) bajo objetivo de inmersión (100X) (*Ver figura 35A*).

3.1.8.3.2 Ensayo Ab-Fluoresceína (Ab-FITC)

El ensayo consiste en el empleo de anticuerpo (Ab) antiDIG marcado con el fluorocromo fluoresceína (FITC) (Antidigoxigenin-Fluorescein, *Roche*[®]) que permitirá poner de manifiesto el anticuerpo mediante el uso de microscopía de fluorescencia. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- 1) Los espermatozoides fueron incubados con el plásmido marcado con DIG.

- 2) Transcurrido el período de incubación (24 h) los espermatozoides fueron centrifugados a 300g x 5 min para eliminar el exceso de plásmido no unido.
- 3) El precipitado se resuspendió para su fijación en paraformaldehído al 1% y se conservó en la nevera (4°C) hasta el momento del marcaje.
- 4) Para el ensayo, los espermatozoides fueron lavados previamente mediante centrifugación a 300g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en PBS.
- 5) A partir de las suspensiones resultantes se realizaron las extensiones espermáticas en sus portaobjetos correspondientes.
- 6) Las extensiones, una vez secadas al aire, se lavaron 3 veces durante 5 min en PBS.
- 7) Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo realizamos un bloqueo previo con PBS al 1% de BSA durante 15 min.
- 8) Incubamos en cámara húmeda (para evitar el secado del medio con anticuerpo) y a temperatura ambiente con el anticuerpo antiDIG-FITC (diluido 1:10 en PBS-1% BSA: 495 µl de PBS-BSA 1% y 5 µl de Ab) durante 1 h.
- 9) Se realizó un nuevo lavado de las muestras (3 veces durante 5 min).
- 10) Sin dejar secar, montamos los cubreobjetos con las muestras empleando cubres redondos y medio de montaje para fluorescencia (*Dako. Fluorescent Mounting Medium*).

Los espermatozoides se analizaron haciendo uso de microscopía de fluorescencia (*Leica*[®] modelo DMLS), mediante filtro de excitación a 580 nm y bajo objetivo de inmersión (100X) (*Ver figura 35B*).

3.1.8.3.3 Ensayo con oro coloidal

Para este ensayo previamente se fijaron los espermatozoides (*in toto*) sobre una rejilla de cobre para posteriormente incubarlos con el anticuerpo antiDIG, detectado en este caso con un segundo anticuerpo marcado con oro coloidal (anti-antiDIG marcado con oro coloidal, EM-Goat Antimouse IgG + IgM:15nm Gold, BB International). La preparación de las rejillas se detalla a continuación:

- 1) Colocamos 3 µl de la suspensión espermática en la rejilla de cobre, y dejamos secar durante una hora. Una vez fijados los espermatozoides a la superficie de las rejillas, éstas se fueron colocando en los sucesivos pasos

- sobre gotas realizadas en una superficie plástica elaborada con *Parafilm*.
- 2) Lavamos en gotas (50 μ l) de PBS durante 5 min.
 - 3) Bloqueamos las uniones inespecíficas colocando las rejillas en gotas (50 μ l) de PBS y 1% BSA (10 min).
 - 4) Incubamos con un primer anticuerpo monoclonal antiDIG durante 60 min (Antidigoxigenina, *Roche*[®]) empleando gotas de 15-20 μ l.
 - 5) Lavamos nuevamente con PBS 3 veces durante 5 min para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.
 - 6) Bloqueamos las uniones inespecíficas colocando las rejillas en gotas (50 μ l) de NGS (*Normal Goat Serum*) durante 60 min.
 - 7) Incubamos con el segundo anticuerpo marcado con oro coloidal y específico para la región constante del primer anticuerpo durante 60 min.
 - 8) Lavamos con PBS 3 veces durante 5 min.
 - 9) Lavamos abundantemente con agua bidestilada.
 - 10) Una vez que las rejillas se encuentran debidamente lavadas, las dejamos secar al aire sobre papel de filtro depositando la superficie que contiene los espermatozoides hacia arriba.

Una vez concluido el proceso de marcaje de las rejillas los espermatozoides se analizaron por microscopía electrónica mediante su observación directa en el microscopio PHILIPS TECNAI 12 (*Figura 36 A y B*) con capacidad de captura de imagen digital para el análisis de las imágenes obtenidas. En la *figura 36* podemos ver las imágenes de los espermatozoides obtenidas por microscopía electrónica.

FIGURA 35. Imágenes de espermatozoides incubados con ADN marcado con digoxigenina (DIG) y revelado por técnicas inmunocitoquímicas. (a) Imágenes de microscopía óptica (1000X) de espermatozoides incubados con anticuerpos anti-DIG marcados con HRP. (b) Imágenes de microscopía de fluorescencia (1000X) de espermatozoides incubados con anticuerpos anti-DIG marcados con FITC. En ambos apartados las imágenes muestran las distintas localizaciones del plásmido en las células espermáticas.

A



B

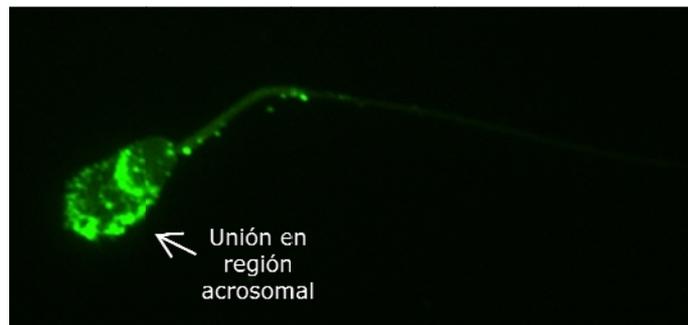
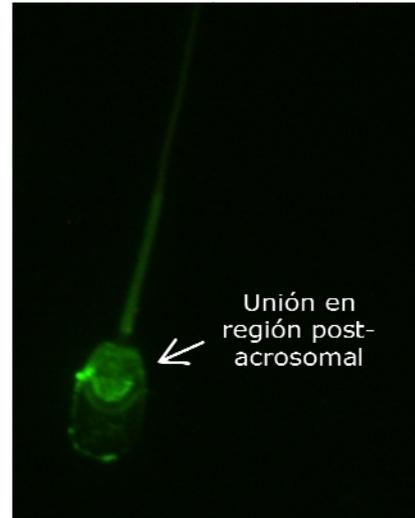
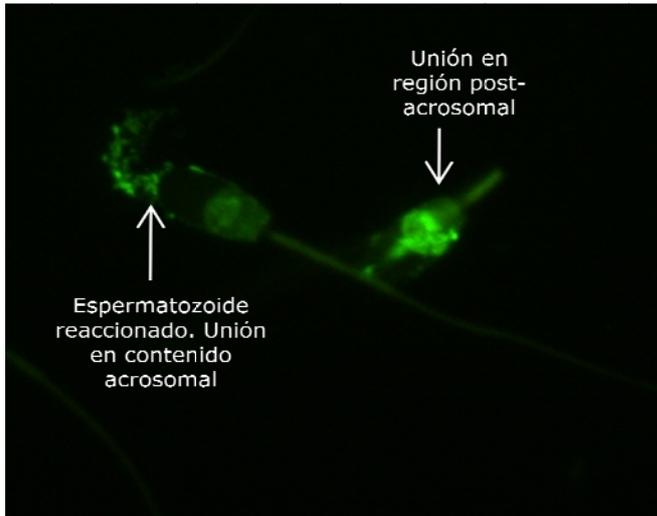
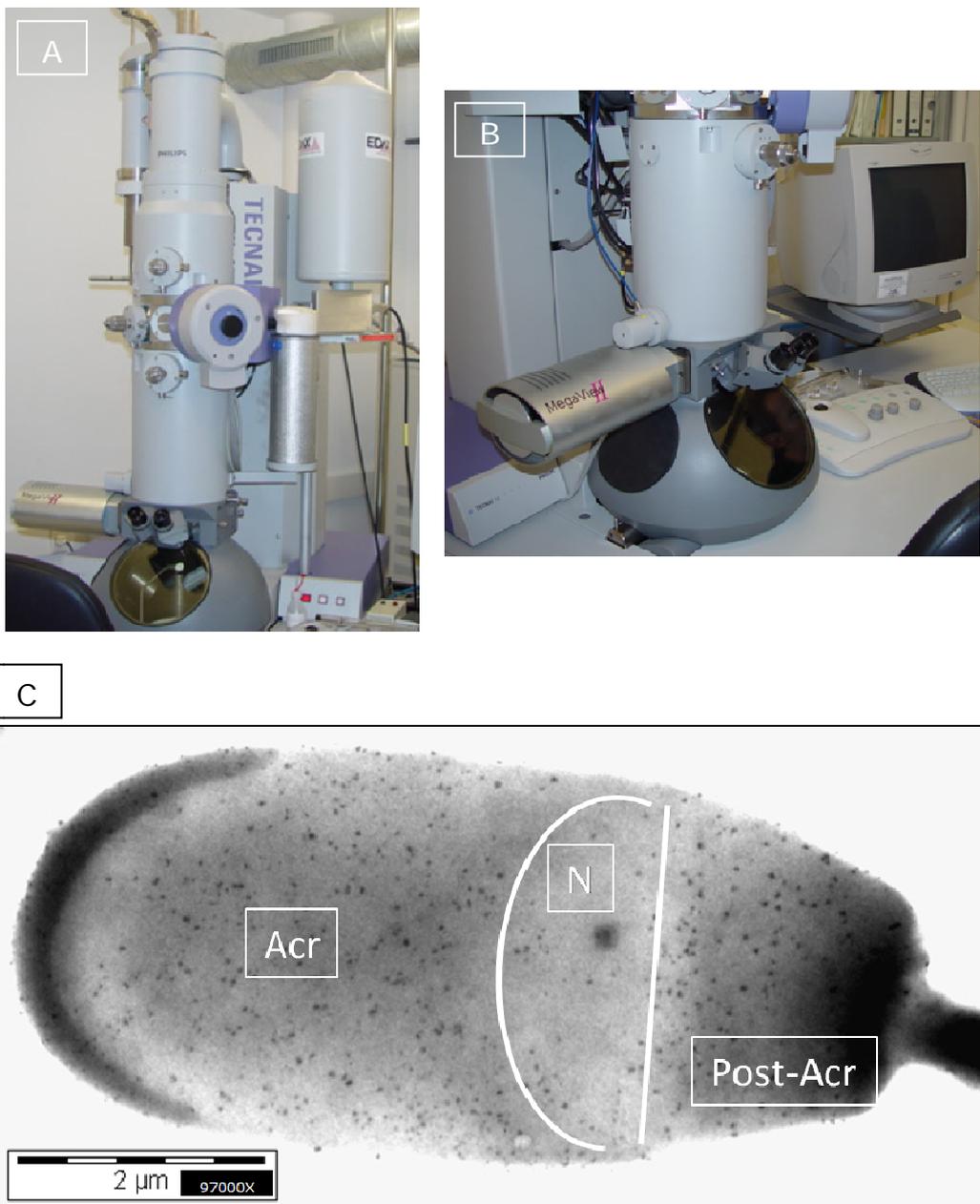
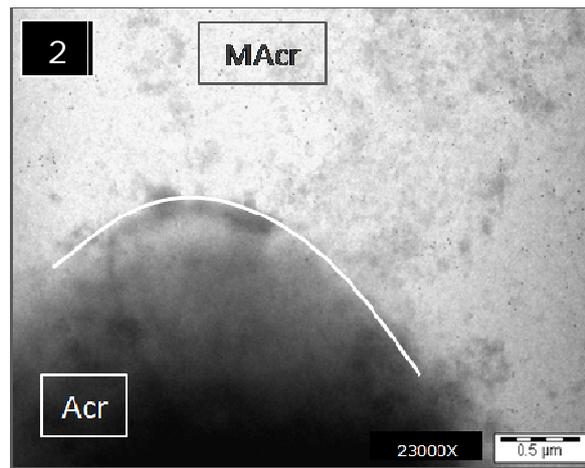
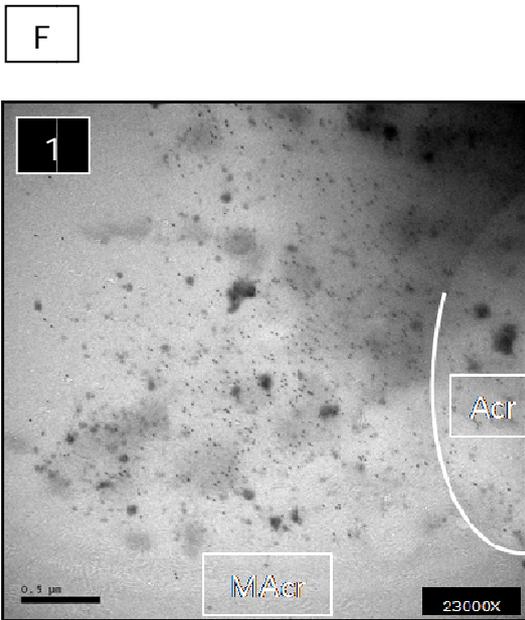
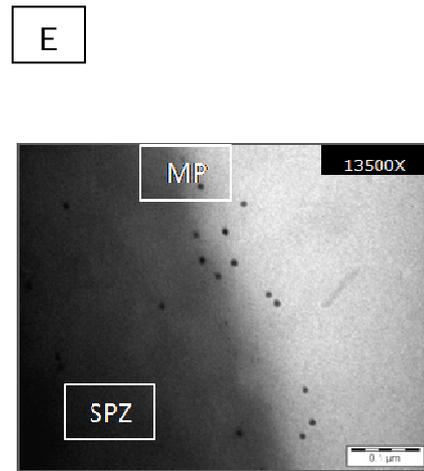
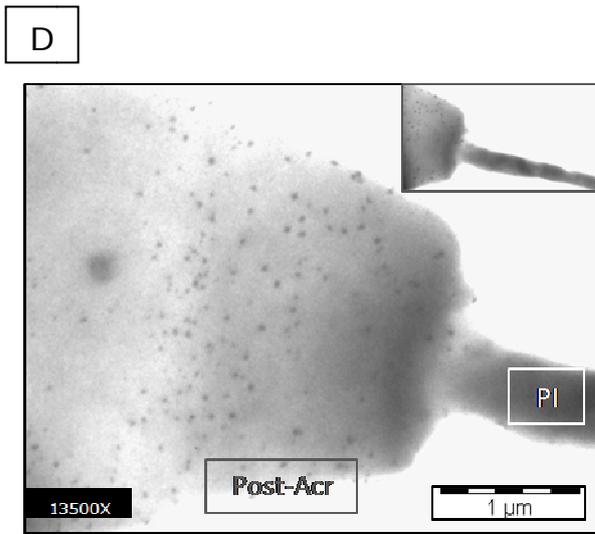


FIGURA 36. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión. (a y b) Equipo de microscopía electrónica de transmisión utilizado en nuestros experimentos (PHILIPS TECNAI 12). (c-g) Imágenes de espermatozoides incubados con ADN marcado con digoxigenina, y con anticuerpos primarios (anti-DIG) y secundarios (antimouse gold) donde los puntos negros corresponden a las partículas de oro. En la imagen (c) observamos el ADN unido a la región acrosomal (Acr) del espermatozoide, a la región postacrosomal (Post-Acr), y a la zona correspondiente al segmento ecuatorial (N) (97.000X); en la imagen (d) el ADN se encuentra unido a la región postacrosomal, y observamos que la pieza intermedia (PI) se encuentra libre de partículas de oro (13.500X). En la imagen (e) se muestra con detalle la unión del transgén a la membrana plasmática (MP) (13.500X). Otra de las localizaciones del ADN es la matriz acrosomal (MAcr) (imagen f1: espermatozoides congelados-descongelados; y f2: procesados por congelación rápida) (23.000X). En la imagen (g), observamos las partículas de oro adheridas a la zona apical del acrosoma en un espermatozoide intacto (37.000X).





3.2 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS

3.2.1 ANIMALES Y MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ovarios de hembras prepúberes (híbridas comerciales) de 90-100 kg de peso sacrificadas en el matadero "EL POZO" de la empresa *Fuertes S.A.* situado en Alhama de Murcia (Murcia, España). Los ovarios se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio higiénico de los animales y se depositaron en termos que contenían solución salina a 37°C para su traslado hasta los laboratorios del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de Murcia. Desde el sacrificio del animal hasta la obtención de los ovocitos no transcurrieron más de 2 h.

3.2.2 MEDIOS DE LAVADO Y MANIPULACIÓN DE GAMETOS

Los medios utilizados para el transporte y lavado de los ovarios, así como para la obtención de los ovocitos fueron los siguientes:

- **Solución Salina (SS):** 0.9% w/v de NaCl con 100 mg/l de sulfato de kanamicina.

- **Solución de cetrimida** (Bromuro de hexadecil-trimetilamonio: *Cetab*) al 0.04% (w/v).

Ambas soluciones fueron preparadas con agua purificada (Mili-RX) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso en el lavado y recogida de ovarios.

- **Tampón Fosfato Salino de Dulbecco modificado (PBS)** (Sigma D-8662) suplementado con 1 mg/ml de alcohol polivinílico y 0.005 mg/l de rojo fenol como indicador de pH. Este medio se conservó a 4°C hasta su utilización en la manipulación y lavado de los ovocitos.

El medio utilizado para el lavado de los ovocitos maduros, y durante la inyección (ICSI) fue **PBS suplementado** con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS; *Biological Industries*[®], Haemek, Israel).

3.2.3 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Los medios para la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* (FIV e ICSI), y cultivo *in vitro* de embriones (CE) se detallan a continuación:

Medio **NCSU-37 stock**. Se preparó en el laboratorio una solución stock (*Tabla 15*) con agua ultrapura (Milli-Q). A continuación, se esterilizó por filtración haciéndolo pasar a través de un filtro de membrana con diámetro de 0.22 μm y se conservó en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

TABLA 15. Composición del medio NCSU-37 stock (Peters & Wells 1993).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108.73
NaHCO₃	25.07
KCl	4.78
KH₂PO₄	1.19
MgSO₄•7H₂O	1.19
CaCl₂•2H₂O	1.70
Glucosa	5.55
D-Sorbitol	12.00
Penicilina G sódica	0.18
Sulfato de estreptomicina	39.00 UI/ml

Para la MIV, el medio NCSU-37 stock se suplementó con cisteína, β -mercaptoetanol, insulina, dibutiril AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG y hCG (*Foligón*[®], *Chorulón*[®]; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) tal y como describen *Funahashi et al.* (1997) y como se refleja en la *tabla 16*.

TABLA 16. Suplementos del medio NCSU-37 para maduración *in vitro* de ovocitos porcinos (Funahashi *et al.* 1997).

Componente	Concentración
Cisteína	0.57 mM
β-mercaptoetanol	50.00 μM
Insulina	5.00 mg/l
dbAMPc	1.00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
hCG	10 UI/ml

Medio **TALP (Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate)**. La solución stock (Tabla 17) fue elaborada en el laboratorio con agua ultrapura. A continuación, se esterilizó mediante filtración y se conservó bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

TABLA 17. Composición del medio TALP stock (Rath *et al.* 1999).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114.06
NaHCO₃	25.07
KCl	3.20
NaH₂PO₄•H₂O	0.35
MgCl₂•6H₂O	0.50
Lactato Ca•5H₂O	8.00
Lactato sódico	10.00
Glucosa	5.00
Cafeína	2.00
Sulfato de kanamicina	0.17
Rojo fenol	0.003
PVA	1 mg/ml

Para el cultivo posterior a la ICSI, el medio TALP stock se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) y 0.12 mg/ml de piruvato sódico, tal y como describen *Rath et al.* (1999). El pH se ajustó hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO₂, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante 20 h antes de su uso.

Medio NCSU-23. Siguiendo el protocolo de *Peters & Wells* (1993), se elaboró una solución stock (*Tabla 18*) con agua ultrapura, se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C durante un máximo de dos semanas. En el momento de su uso para CE, el NCSU-23 stock se suplementó con 4 mg/ml de BSA-FAF, insulina 0.57 mM, β-mercaptoetanol 50 μM, 2% (v/v) de BME (*aminoacids solution* 50x) y 1% (v/v) de MEM (*non-essential amino acid solution* 100x). Se filtró y se introdujo en el incubador un día antes de su uso.

Mientras no se especifique lo contrario, cuando se haga referencia a un medio de cultivo se entenderá como finalmente suplementado para FIV, ICSI o CE.

TABLA 18. Composición del medio NCSU-23 stock (*Peters & Wells* 1993).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.70
Glucosa	5.55
Taurina	7.00
Hipotaurina	5.00
Penicilina G sódica	0.18
Sulfato de estreptomicina	39 UI/ml

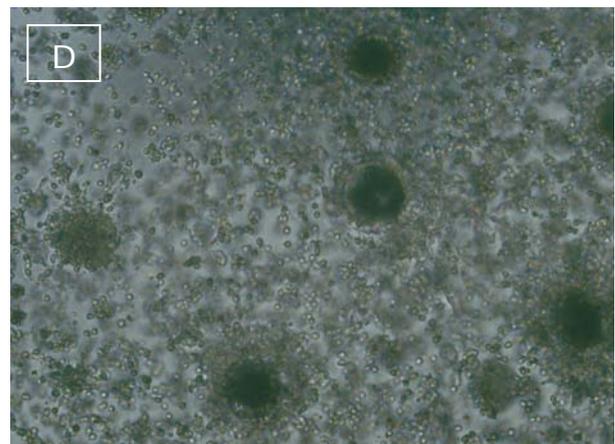
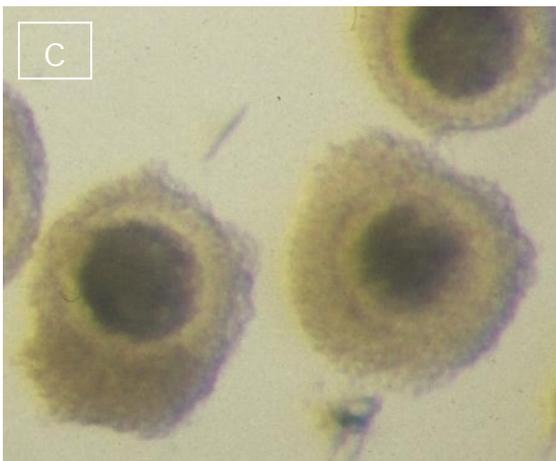
3.2.4 MADURACIÓN *IN VITRO* (MIV) DE OVOCITOS

El transporte hacia el laboratorio se realizó en un recipiente isoterma con SS a 38°C en un plazo máximo de 1 h desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, los ovarios se sometieron a dos lavados en Cetab, dos en SS atemperada y se procedió a la obtención de los ovocitos en PBS. Los ovocitos se obtuvieron seccionando con hoja de bisturí los folículos ováricos con un diámetro entre 3-6 mm (*Figura 37A*). El contenido folicular se recogió en tubos estériles y se resuspendió en PBS atemperado dejándolo sedimentar aproximadamente durante 5 min. Pasado este tiempo, el sedimento se diluyó con PBS nuevo. Bajo el estereomicroscopio (*Nikon*[®] SMZ-10A) (*Figura 37B*) y a 20X, se seleccionaron aquellos ovocitos rodeados por varias capas de células del *cumulus oophorus* con un aspecto compacto y con un citoplasma homogéneo y granuloso (*Figura 37C*). Los complejos células del *cumulus oophorus-ovocito* (COCs) se aspiraron con una pipeta *Pasteur* adelgazada con el extremo romo y conectada a un tubo flexible de silicona.

Los COCs seleccionados se lavaron una vez en PBS atemperado y dos veces en medio NCSU-37 previamente equilibrado a 38.5°C en el incubador (*Heraeus*[®] Function live BB16, Heraeus instruments) con 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante al menos 3 h. El cultivo se llevó a cabo en grupos de 45-50 COCs en un volumen de medio de 500 µl. Pasadas 20-22 h de cultivo, los COCs fueron transferidos a medio NCSU-37 libre de PMSG, hCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante 20-22 h (Funahashi & Day 1993).

FIGURA 37. Obtención y selección de ovocitos. (a) Sección de los folículos ováricos con el bisturí. (b) Estereomicroscopio (*Nikon*[®] SMZ-10A) utilizado para la observación y selección de ovocitos. (c) Ovocitos inmaduros rodeados de células del *cumulus oophorus* con un aspecto compacto. (d) Ovocitos maduros rodeados de células del *cumulus oophorus* expandidas.



3.2.5 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

Tras la maduración de los ovocitos (*Figura 37D*), se procedió a la eliminación de las células del *cumulus* mediante sucesivos pases de los COCs a través de una pipeta automática. A continuación, los ovocitos desnudos se lavaron dos veces en la solución de PBS suplementado y finalmente fueron colocados en las placas de microinyección.

Sobre las placas donde se realizó la microinyección (*Falcon® petri dish* 50x9mm) se dispusieron varias gotas centrales de 4 µl de la solución de PBS suplementado con 1 µl de semen, rodeadas por un número variable de gotas del medio con los ovocitos. Cada gota de 4 µl contenía un ovocito. Las microgotas se recubrieron con aceite mineral (*embryo tested*) distribuido por toda la placa de microinyección.

La ICSI se realizó con un microscopio invertido *Nikon® Diaphot 300* con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan® NK (Eppendorf®)* y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil (Eppendorf®)* (*Figura 38 A y B*). Una vez preparada la placa se procedió a la microinyección, mediante una pipeta *Eppendorf® Custom Tip sterile* (diámetro interno 8 µm) se aspiró un pequeño volumen del medio libre de espermatozoides, y a continuación se dispuso en una gota que contenía espermatozoides donde se seleccionó e inmovilizó al espermatozoide que íbamos a microinyectar, aspirando desde la cola de forma que la cabeza espermática quedaba más cerca de la entrada de la pipeta. Una vez capturado el espermatozoide se procedió a la fijación del ovocito mediante la pipeta de sujeción (*Eppendorf® Sterile VacuTips*), colocando el ovocito previamente madurado y desnudo con el corpúsculo polar en posición 6 ó 12 horarias. A continuación, se presionó con la pipeta de microinyección en la posición de las 3 horarias para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática (*Figura 38C*). Se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma para confirmar que se había atravesado la membrana plasmática del ovocito, y el espermatozoide se inyectó en el interior del citoplasma. Por último, se retiró la pipeta de microinyección y se liberó al ovocito. Tras la microinyección, los ovocitos se lavaron en el medio TALP y se dispusieron en el incubador en unas condiciones de 38.5°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante 20-22 h.

3.2.6 PREPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PARA ICSI

El procesado y preparación de los espermatozoides, sometidos a diferentes procesos (intactos, congelados-descongelados, congelación rápida, Tritón X-100, RecA), utilizados para la fecundación *in vitro* por ICSI, se llevó a cabo tal y como se describe en los *apartados 3.1.6 y 3.1.7*.

El semen junto con el ADN fue incubado durante un mínimo de 30 min a 16°C. Tras este periodo de incubación, se calentó la suspensión espermática en estufa durante 10 min a 38.5°C, como paso previo al proceso de ICSI.

Para su dilución se tomaron 2 µl de la suspensión de espermatozoides correspondiente y se completaron con 500 µl de PBS (precalentado a 38°C) suplementado con suero fetal bovino al 10%. De esta muestra se dispuso un volumen de 1 µl en cada una de las gotas centrales (4 µl PBS + Suero) de la placa de *petri* utilizada para la microinyección (descrita en *apartado 3.2.5*).

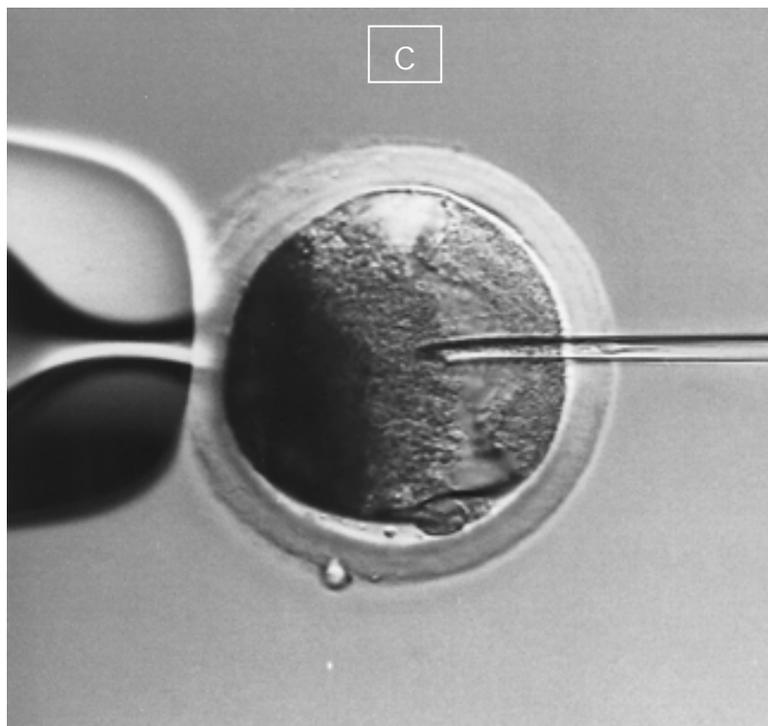
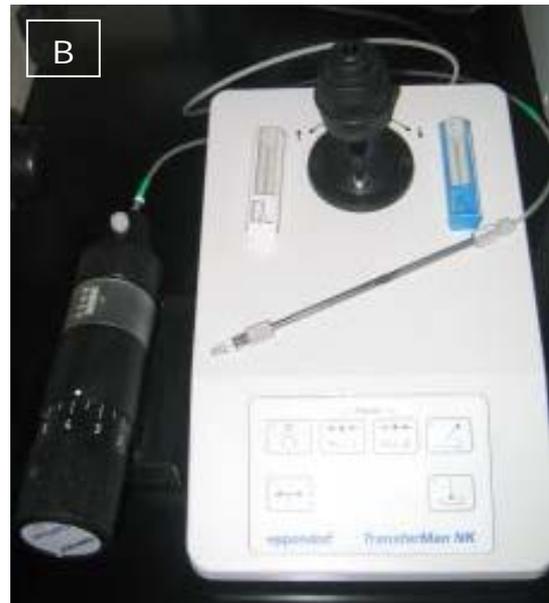
3.2.7 FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV)

Los ovocitos, una vez madurados *in vitro* (*apartado 3.2.4*), se decumularon y se dispusieron en grupos de 25 unidades en placas de 4 pocillos con 250 µl de medio de fecundación TALP. Posteriormente, se les añadieron los espermatozoides preparados en una suspensión de 250 µl en medio TALP. Transcurridas 2 h de co-incubación, los supuestos cigotos se pipetearon suavemente para eliminar los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida. Tras esto se dispusieron en microgotas con medio de cultivo embrionario NCSU-23 (previamente lavados en placas con 2 ml de dicho medio).

3.2.8 PREPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PARA FIV

Los espermatozoides empleados en estas experiencias fueron procesados de acuerdo a lo descrito en los *apartados 3.1.6* (espermatozoides intactos e incubados con ADN) y *3.1.7* (espermatozoides incubados con ADN y RecA). La concentración de espermatozoides utilizada para la FIV osciló entre $0.25-1 \times 10^6$ espermatozoides por cada 25 ovocitos, dependiendo dicha concentración de la calidad seminal observada tras el tratamiento realizado.

FIGURA 38. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides. (a) Microscopio invertido *Nikon® Diaphot 300* equipado con los micromanipuladores *TransferMan® NK* (*Eppendorf*) y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil* (*Eppendorf*). (b) Imagen ampliada del microinyector y micromanipulador. (c) Inyección intracitoplasmática de espermatozoide con pipeta de sujeción y pipeta de inyección, ovocito con CP visible a las 6 horarias.



3.2.9 CULTIVO DE EMBRIONES

A las 2 h (en el caso de FIV) y a las 20-24 h (en el caso de ICSI) tras la fecundación *in vitro*, los presuntos cigotos se trasladaron a medio NCSU-23 previamente equilibrado. Tras lo cual se dispusieron en microgotas con medio de cultivo embrionario NCSU-23 (previamente lavados en placas con 2 ml de dicho medio), a razón de 1 μ l de medio/embrión (aproximadamente 25 embriones por gota), y se cubrieron con aceite mineral (*embryo tested*). A las 48 h post-fecundación se seleccionaron, bajo el estereomicroscopio, únicamente aquellos embriones que se encontraban divididos en estadio de 2-4 células, y se trasladaron de nuevo a microgotas con medio NCSU-23 nuevo. El cultivo de embriones se mantuvo en estas condiciones hasta los 7 días post-fecundación en las condiciones de 38.5°C de temperatura y 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

3.2.10 VALORACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS

3.2.10.1 Valoración del desarrollo embrionario

Se consideraron embriones divididos aquellos que a las 48 h post-fecundación se encontraban en estadio de 2-4 células con blastómeras homogéneas. Por otra parte, una vez finalizado el período de cultivo de 7 días, se aislaron bajo el estereomicroscopio (5X) aquellos embriones con aspecto de blastocisto y se trasladaron a PBS atemperado. Seguidamente, se procesaron para valorar la calidad embrionaria según el número de blastómeras por embrión siguiendo la técnica descrita por *Dobrinsky et al.* (1996). Los blastocistos se fijaron en alcohol sobre un portaobjetos durante un período de 24 h y posteriormente se tiñeron con una solución Hoescht 33342 al 1% en PBS para teñir los núcleos celulares. Tras la tinción, los embriones se visualizaron inmediatamente en un microscopio (*Leica*[®] modelo DMLS) de fluorescencia a 400X y filtro UV de 495 nm de longitud de onda. Por último, se contabilizaron todos los núcleos considerándose el número total de células por blastocisto como el número total de núcleos teñidos (*Figura 39*).

Las variables estudiadas en esta experiencia se detallan a continuación:

- Porcentaje de división embrionaria (**% División**): se contabilizó el número de embriones en estadio de 2-4 células con respecto al total de los cigotos que iniciaron el cultivo embrionario.
- Porcentaje de blastocistos (**% Blastocistos**): se valoró el número de blastocistos con respecto al total de embriones divididos.
- Número medio de células por blastocisto (**Nº cels/blastocisto**): se calculó como el número medio de núcleos teñidos por blastocisto.

3.2.10.2 Valoración de los embriones transgénicos

Los embriones obtenidos por FIV o ICSI, que presentaron división a las 48 h post-fecundación, fueron evaluados a los 7 días para detectar la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP, calculando el porcentaje de embriones que expresaban total o parcialmente la misma. Para ello se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia (*Nikon*[®] Diaphot 300) con un rango de excitación de 395-470 nm y un espectro de emisión de 509 nm. Los embriones se clasificaron en 2 grupos: 1) Con expresión de la proteína verde fluorescente (emiten luz verde fluorescente), 2) Sin expresión de la proteína verde fluorescente (no hay signos de fluorescencia). En la *figura 40* podemos observar varios embriones transgénicos en diferentes estadios obtenidos por ICSI, y cultivados durante 7 días en NCSU-23.

FIGURA 39. Cultivo de embriones porcinos. (a) Embriones en estadio 2-4 células observados en el microscopio invertido (contraste *Hoffman* 20X). (b) Blastocisto eclosionando (contraste *Hoffman* 20X). (c) Blastocisto teñido con Hoescht 33342 donde los núcleos de las blastómeras aparecen teñidos de azul (microscopio de epifluorescencia 20X).

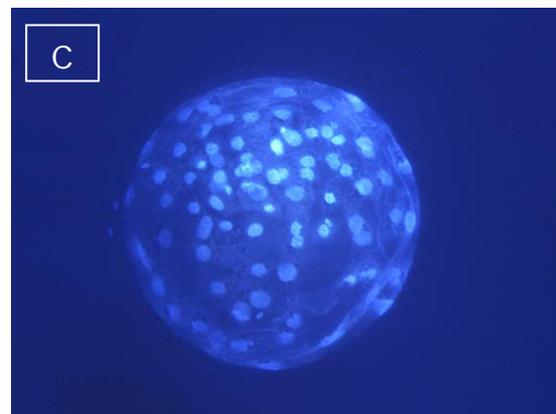
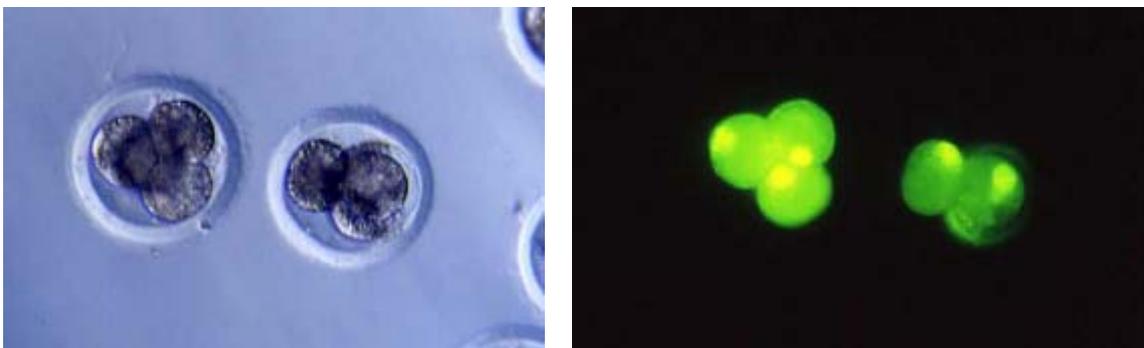
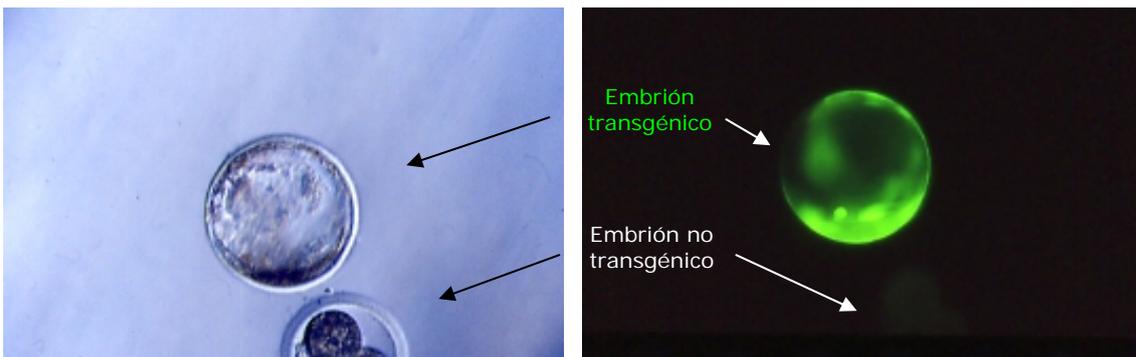


FIGURA 40. Embriones porcinos obtenidos mediante ICSI-SMGT expresando la proteína EGFP en diferentes estadios de desarrollo. Imágenes obtenidas en el microscopio invertido *Nikon® Diaphot 300* con contraste *Hoffman* y epifluorescencia (filtro B2) para EGFP. (a) Embriones que expresan EGFP en estadio de 2 y 3 células (20X). (b y c) Blastocistos (20X y 40X, respectivamente). (d) Blastocisto eclosionado que expresa la proteína verde fluorescente (20X).

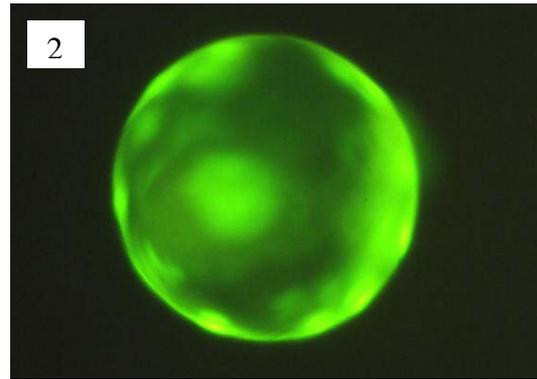
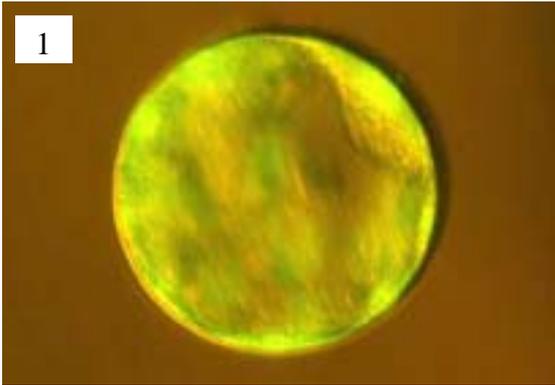
A



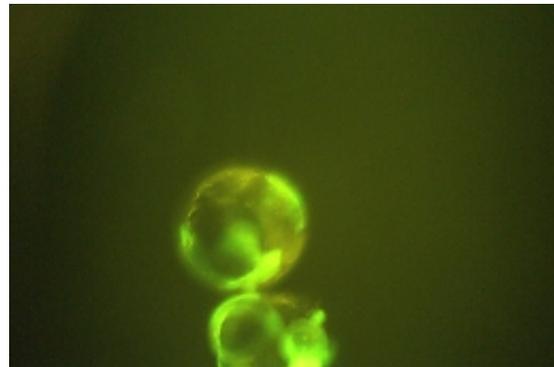
B



C



D



3.3 INSEMINACIONES Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES Y LECHONES TRANSGÉNICOS)

3.3.1 ANIMALES

Los experimentos fueron llevados a cabo en el Área de Investigación del Departamento de Fisiología en la Granja de la Facultad de Veterinaria. Se utilizaron un total de 12 hembras. Para las inseminaciones no quirúrgicas se utilizaron 4 hembras multíparas (2ª gestación) dos de ellas raza *Duroc* y las otras dos cruces de *Landrace X Large White*. Para las inseminaciones quirúrgicas y para las transferencias de embriones se utilizaron 8 hembras prepúberes todas ellas *Landrace X Large White*. Fueron alojadas en jaulas individuales o en parques en grupos de dos, con una ración de comida diaria y agua *ad libitum*, con una temperatura ambiental que variaba entre 20-25°C y sometidas a condiciones naturales de luz.

3.3.2 INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DEL CELO

Con el propósito de sincronizar el ciclo estral, para el caso de cerdas multíparas, en primer lugar se inyectó vía intramuscular (i.m.) prostaglandina PG-F2 α (*Dinolityc*®) pasados 15 días desde el último ciclo, para producir la lisis de posibles cuerpos lúteos y reinicio del ciclo estral. Para la inducción del celo y superovulación, tanto en hembras multíparas (pasadas 48 h tras la inyección de la prostaglandina) como prepúberes, se administró vía i.m. 1250 U.I de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) (*Folligon*®; Intervet) seguidos 72 h después de 750 U.I de Gonadotropina Corionica Humana (hCG) (*Veterin Corion*®, Divisa Farmavic S.A., Barcelona). La detección del estro fue llevada a cabo cada 6 h a partir de 32 h tras la inyección de hCG, mediante determinación del reflejo de inmovilidad y aspecto que presentaba la vulva, y mediante el uso de técnicas ultrasonográficas (descrito a continuación) (*Figura 41 A y B*).

3.3.3 DIAGNÓSTICO POR ECOGRAFÍA DE LA OVULACIÓN Y DE LA GESTACIÓN

El ecógrafo utilizado fue 100 FALCO-VET (Esaote España, S.A., Barcelona), tanto para diagnóstico de gestación, mediante una sonda microconvex de aplicación abdominal (5-7.5 MHz), como para seguimiento del crecimiento folicular y momento de ovulación, mediante sonda endorrectal (6-8 MHz).

La detección del estro y de la ovulación fue llevada a cabo mediante seguimiento del crecimiento folicular (áreas anecoicas en el ovario con un tamaño entre 3-6 mm de diámetro) (*Figura 41 A y B*) a partir de 32 h tras la inyección de hCG. El diagnóstico de gestación, por su parte, se llevó a cabo a los 25-28 días tras la fecundación. Tras la limpieza de la zona y la deposición de gel se aplicó la sonda ecográfica en la región ventral, entre las dos últimas mamas, realizando un barrido por la zona valorando la presencia de vesículas embrionarias. Se consideró positiva la gestación cuando se visualizaron las vesículas embrionarias de un tamaño de 15 a 20 mm de diámetro. Se observaron como áreas bien definidas, regulares y anecoicas. En la *figura 42* (A y B) aparecen dos imágenes ecográficas de una hembra gestante por inseminación intrauterina profunda, y en la *figura 46B* el seguimiento de una cerda gestante por transferencia de embriones.

3.3.4 INSEMINACIÓN INTRAUTERINA PROFUNDA

Para esta experiencia fueron inseminadas 4 cerdas multíparas (2ª gestación), dos de ellas eran cruces de *Landrace X Large White* y las otras dos restantes de raza *Duroc*.

3.3.4.1 Preparación del semen

El semen fue preparado como se ha descrito en el *apartado 3.1.6*, utilizando semen fresco (intacto). Se preparó en la siguiente relación: 1000×10^6 espermatozoides/250 μ l ADN (solución *stock* de EGFP 200 ng/ μ l) en un volumen total de 10 ml de medio SFM/BSA. Se incubó esta suspensión a 16°C durante 2 h, moviendo los tubos cada cierto tiempo para evitar la sedimentación. La muestra fue posteriormente calentada a 37°C durante 10 min antes de la inseminación.

3.3.4.2 Cateterización intrauterina profunda

La inseminación fue llevada a cabo a las 36-40 h tras la administración de hCG. Se utilizaron dos catéteres, uno de ellos un catéter convencional de inseminación cervical que sirve de guía para el otro catéter, una sonda flexible de 1.80 m de longitud, 4 mm de diámetro exterior y 1.8 mm de diámetro interior (*Fireflex*[®], Magapor S.L., Zaragoza) (*Figura 41C*). Antes de la inserción, la espiral del catéter comercial para IA (Magapor S.L., Zaragoza), fue lubricada con un medio estéril no espermicida. Se limpió la zona perineal de la cerda y se procedió a la inserción del catéter, una vez en el cérvix de la cerda se continuó con la introducción de la sonda flexible a través del interior del catéter cervical llegando a uno de los cuernos uterinos hasta que la mayor parte de la sonda quedaba introducida (dependiendo del tamaño del animal). Antes de la inseminación se introducen por la sonda 2 ml de medio de dilución (BTS) precalentado a 30°C, a continuación se insemina acoplando al extremo de la sonda una jeringa con los 10 ml correspondientes a la dosis de espermatozoides (30°C), y seguidamente otros 2 ml de medio para arrastrar los restos de dosis que hayan quedado en el interior de la sonda. Finalmente, con cuidado se extrae primero el catéter flexible y a continuación el catéter cervical. Se observan ambos catéteres para visualizar el tipo de secreción, y si se ha producido algún tipo de herida en el proceso. En la *figura 43* podemos observar varios de los lechones obtenidos mediante esta técnica.

Se realizaron dos inseminaciones espaciadas 12 h para cada cerda, con el semen del mismo eyaculado conservado a 16°C.

FIGURA 41. Diagnóstico ecográfico de la ovulación. (a y b) Ecografías de ovarios de cerdas con folículos en crecimiento, cercanos al momento de la ovulación (Equipo ecográfico *100 FALCO-VET* (Esaote España, S.A., Barcelona) con sonda de 6-8 MHz. (c1) Catéter de inseminación artificial porcina cervical junto con la sonda (c2) de inseminación intrauterina profunda (*Fireflex®*).

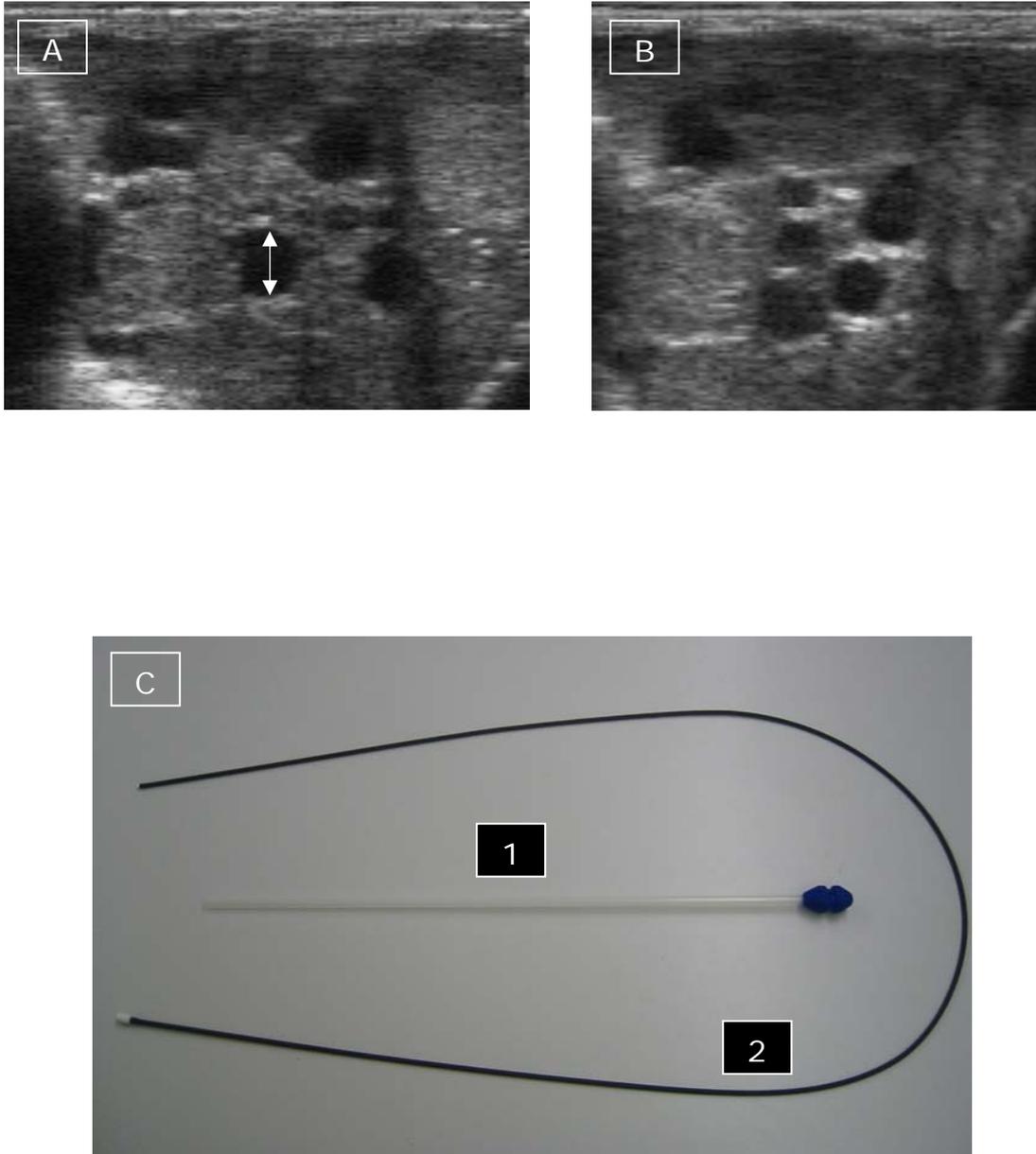


FIGURA 42. Diagnóstico ecográfico de la gestación. (a) Imagen ecográfica del útero de una hembra gestante 28 días post-inseminación, donde se observan varias zonas anecoicas que se corresponden con vesículas embrionarias. (b) Imagen ecográfica del útero de una hembra gestante, 65 días post-inseminación, donde se aprecian las estructuras óseas de un feto. Ambas imágenes corresponden a gestaciones resultantes de la inseminación intrauterina profunda con espermatozoides incubados con ADN. (c) Dos de las hembras inseminadas.

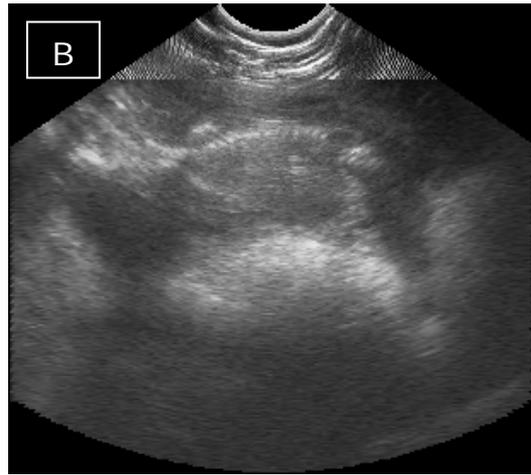
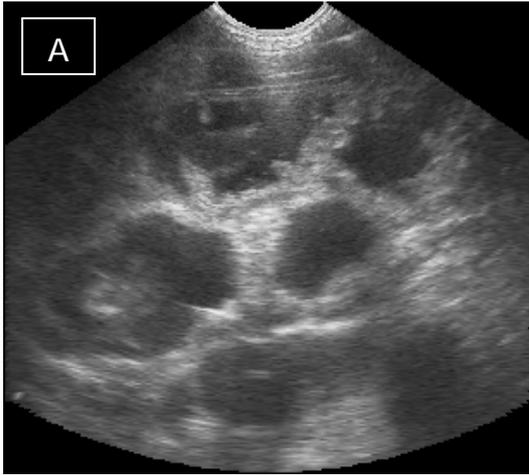


FIGURA 43. (a y b) Lechones nacidos mediante inseminación intrauterina profunda con espermatozoides incubados con ADN. (c) Método de detección de la expresión de la proteína EGFP mediante el empleo de una lámpara de luz UV.



3.3.5 INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS PARA INSEMINACIÓN INTRAUTERINA, TRANSFERENCIA Y RECOGIDA DE EMBRIONES

3.3.5.1 Anestesia y analgesia

La inducción anestésica y analgesia preoperatorias de los animales fue realizada mediante una combinación de Ketamina (100 mg/ml) 10 mg/Kg (*Imalgene*[®] 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona), Medetomidina (1.0 mg) 0.2 mg/kg (*Domtor*[®], Pfizer S.A., Madrid), Midazolam (5 mg/5ml) 0.2 mg/kg (*Dormicum*[®], Roche, Madrid), Morfina Hidrocloruro (20 mg/ml) 0.2 mg/kg (Morfina Braun 2%, B. Braun Medical S.A., Barcelona) administrado vía i.m. hasta alcanzar un plano anestésico que nos permitiera conectar al animal al equipo de anestesia inhalatoria (*Matrix*[®]) mediante el uso de una mascarilla, manteniendo el plano anestésico con isoflurano (*Isoflo*[®], Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona) vaporizado en oxígeno al 2-3%.

Los animales anestesiados se dispusieron en decúbito supino y fueron inmovilizados sobre la mesa de operaciones (*Ver figura 44*).

Para la analgesia postoperatoria se administró morfina 0.2 mg/kg i.m. cada 4 h hasta transcurridas 8-12 h del postoperatorio, continuando la analgesia con buprenorfina (0.3 mg/ml) 0.01 mg/kg i.m. (*Buprex*[®], Schering-Plough, S.A., Madrid) cada 8 h durante 3-4 días.

El estado de los animales durante la cirugía fue controlado en todo momento mediante un monitor multiparamétrico (*Nellcor*[®] N5500, Patient Monitor, Tyco Healthcare Pleasanton CA, USA) donde se analizaban los parámetros fisiológicos: temperatura corporal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, electrocardiograma, presión sanguínea no invasiva y nivel de saturación de oxígeno.

3.3.5.2 Apertura y cierre de la cavidad abdominal

- **Apertura de la cavidad abdominal**: Se procedió a la adecuada antisepsia (*Betadine*[®], Lab Sarget, Tecnodial S.A., Madrid) de la región abdominal en la zona correspondiente a las dos últimas mamas, y al aislamiento del campo quirúrgico mediante la colocación de un paño estéril. A continuación,

se realizó una laparotomía ventral mediante incisión con bisturí y se procedió a la disección roma de la grasa subcutánea, incidiendo sobre la fascia y el músculo recto abdominal hasta la visualización del peritoneo. Este último se abrió mediante un pequeño corte con el extremo de tijera *Metzemaum* y a continuación se colocó un separador abdominal. Posteriormente, se localizó un cuerno uterino y se exteriorizó hasta poder visualizar el oviducto y el ovario.

- **Cierre de la cavidad abdominal:** La cavidad abdominal se cerró en 4 planos. En los tres primeros, correspondientes a la capa muscular, peritoneo, fascia de la muscular y al tejido subcutáneo con la grasa propia, se utilizó nylon del número 3 y se realizó una sutura continua con puntos de refuerzo. En cuanto al plano correspondiente a la piel se suturó mediante puntos simples con seda nº 3-4.

El cuerno uterino, junto con el oviducto y ovario manipulados fueron lavados continuamente con solución salina fisiológica atemperada, para evitar adherencias, y reintroducidos en la cavidad abdominal.

Para prevenir posibles infecciones se le administró al animal amoxicilina con efecto retardado (*Bivamox*[®] Boehringer Ingelheim S.A., Barcelona, España) durante 4-5 días y sobre la herida se aplicó con un aerosol antibacteriano y antiséptico de acción tópica (Oxitetraciclina; *Veterin-Tenico*[®], Intervet, Salamanca).

3.3.5.3 Inseminación intrauterina quirúrgica

3.3.5.3.1 Preparación y transporte de los espermatozoides

La preparación de los espermatozoides fue similar a la realizada para la inseminación intrauterina profunda, pero con una dosis de inseminación menor: 1.5×10^8 espermatozoides/75 μ l ADN (solución *stock* de EGFP 200 ng/ μ l), en un volumen final de 1.5 ml (Fantinati *et al.* 2005) por cuerno uterino. Las muestras fueron incubadas a 16°C durante 2 h y cada pocos minutos y de forma repetida se inclinaron los tubos para evitar la sedimentación.

El transporte se realizó en una estufa portátil a 38°C, desde el laboratorio de Fisiología hasta el quirófano experimental situado en la granja de Veterinaria (2 Km).

3.3.5.3.2 Inseminación intrauterina

Una vez realizada la apertura de la cavidad abdominal, se observaron con detenimiento los ovarios para asegurarnos que la cerda había completado el proceso de ovulación y se determinó el número total de los cuerpos hemorrágicos presentes en los mismos. A continuación, se localizó el oviducto donde se realizó una incisión utilizando una aguja roma para acceder a la luz oviductal (*Figura 44C*), posteriormente se colocó la jeringuilla y fueron depositados los espermatozoides (37°C) en el interior de la ampolla oviductal. En la *figura 44* observamos una secuencia de imágenes del procedimiento llevado a cabo.

3.3.5.3.3 Recogida de embriones

A los 6-7 días tras la inseminación quirúrgica, se procedió a la recogida de los embriones. Tras la apertura y acceso a la cavidad abdominal, ambos cuernos uterinos fueron localizados y expuestos, se realizó una ovariectomía y el tracto reproductivo se conservó en SSF atemperada hasta su traslado al laboratorio (10 min). Una vez en el laboratorio, se realizaron dos lavados con 20 ml de PBS (suplementado con 1mg/ml de alcohol polivinílico (PVA), precalentado a 37°C) de cada uno de los cuernos en dirección oviducto-útero. El medio de lavado inyectado en el cuerno uterino fue recolectado en placas de *Petri*. A su vez se contaron los cuerpos lúteos presentes en cada uno de los ovarios, para obtener el ratio de recogida embriones/cuerpos lúteos.

Los embriones fueron evaluados bajo estereomicroscopio para analizar su desarrollo embrionario y bajo microscopio de fluorescencia tal y como se describe en el *apartado 3.2.10*. En la *figura 44D1* y *44D2* podemos observar dos embriones obtenidos *in vivo* 7 días tras la inseminación intrauterina profunda quirúrgica.

3.3.5.4 Transferencia de embriones

3.3.5.4.1 Preparación y transporte de los cigotos

Una vez inyectados los ovocitos con semen incubado con RecA:ADN (*apartado 3.2.3*), se visualizaron bajo un estereomicroscopio para su localización, y se depositaron en tubos de 500 µl para su transporte. El transporte de embriones se realizó en una estufa portátil a 38°C. Una vez en el

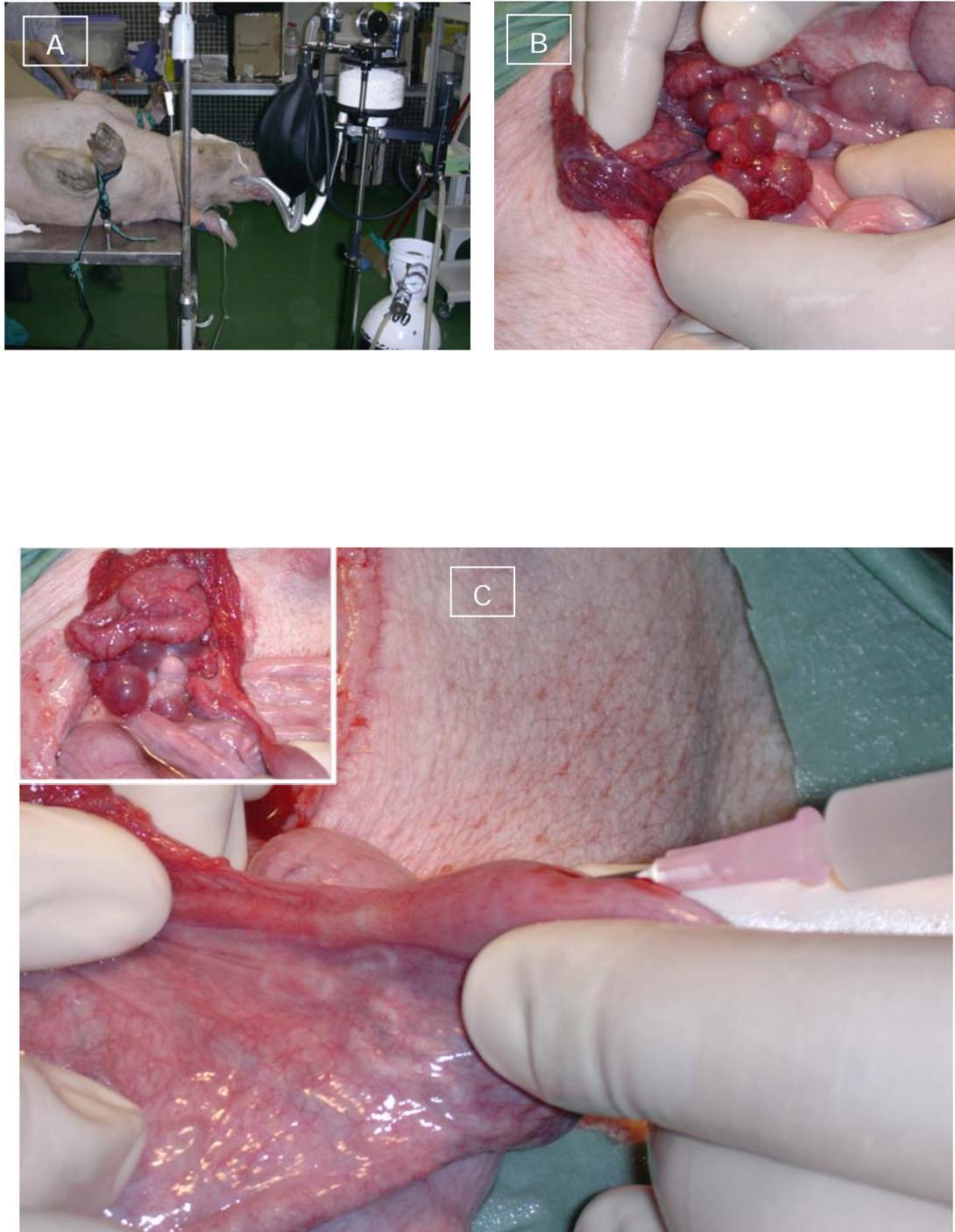
quirófano, se introdujeron mediante aspiración utilizando un sistema de pipeteado (*Micro-Classic*[®], Brand, Germany) conectado a un catéter *Tom Cat* (*Kendall Co.*, Mansfield, MA, USA) con solución PBS atemperada a 38°C. La carga del catéter se realizó de la siguiente manera. En primer lugar se dispuso una columna con el medio de cultivo, a continuación se dejó un espacio con aire y luego se cargaron los embriones contenidos en el medio. Posteriormente, se dispuso la segunda columna de aire y la última nuevamente con el medio. La columna con el medio de cultivo (PBS), ubicada en el extremo abierto del catéter, limpia a éste en el momento de la descarga. La presencia de las columnas con aire impiden el desplazamiento de la columna central, que contiene los embriones y la última garantiza la descarga del embrión por efecto de arrastre.

En todos los casos se procuró que el tiempo transcurrido desde la introducción de los cigotos en las placas para su transporte hasta la transferencia de embriones no fuera superior a 30 min.

3.3.5.4.2 Transferencia de embriones

Una vez que se accedió quirúrgicamente a la cavidad abdominal se observaron con detenimiento los ovarios contándose el número de cuerpos hemorrágicos para asegurarnos que la cerda había completado el proceso de ovulación. A continuación, se localizó en el interior de la bolsa ovárica la abertura del infundíbulo y rápidamente se introdujo el catéter con los cigotos previamente obtenidos por ICSI. Una vez en el interior de los primeros 4-5 cm de la luz del oviducto, el extremo del catéter se sujetó suavemente con los dedos a modo de anillo procurando que la adaptación fuera lo más perfecta posible. Mediante la ayuda de una jeringuilla de 1 ml conectada al catéter se impulsó el contenido de éste a través del oviducto (*Figura 45*). Finalmente, se retiró el catéter y se comprobó con la ayuda de un estereomicroscopio la ausencia de cigotos en el mismo. En la *figura 46A* observamos una hembra tras la transferencia de embriones, y en la *figura 46C* los lechones nacidos mediante esta técnica.

FIGURA 44. Inseminación artificial intrauterina por laparotomía. (a) Animal en mesa quirúrgica conectado a la máquina de anestesia inhalatoria y preparado para la intervención. (b) Ovario con folículos en crecimiento próximos a la ovulación. (c) Inseminación en unión útero-tubárica con espermatozoides incubados con ADN. (d1 y d2) Blastocistos porcinos obtenidos 7 días después de la inseminación quirúrgica y teñidos con Hoescht 33342 para visualizar los núcleos de las blastómeras (40X).



D

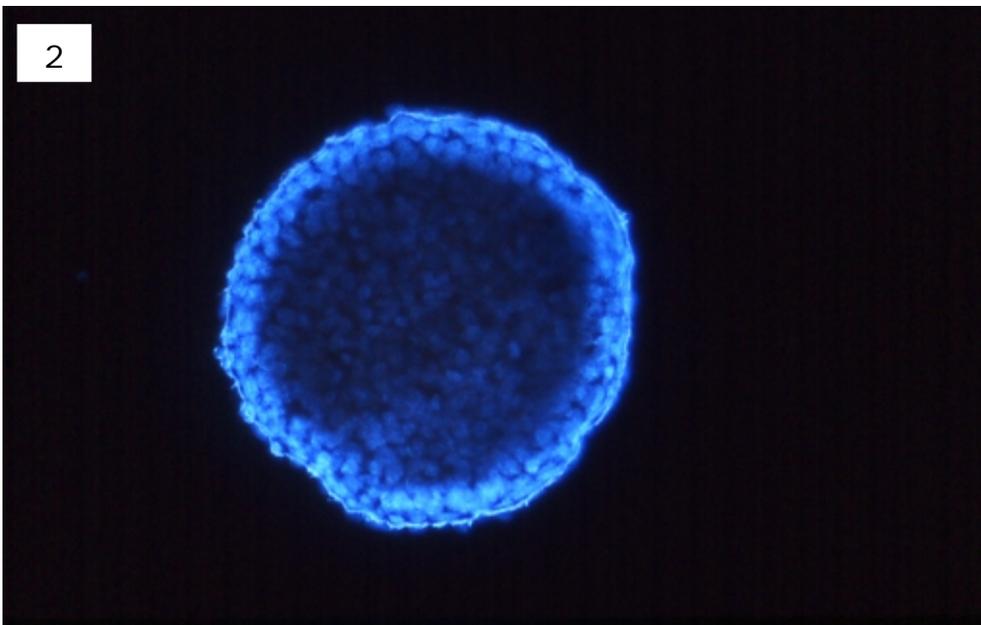
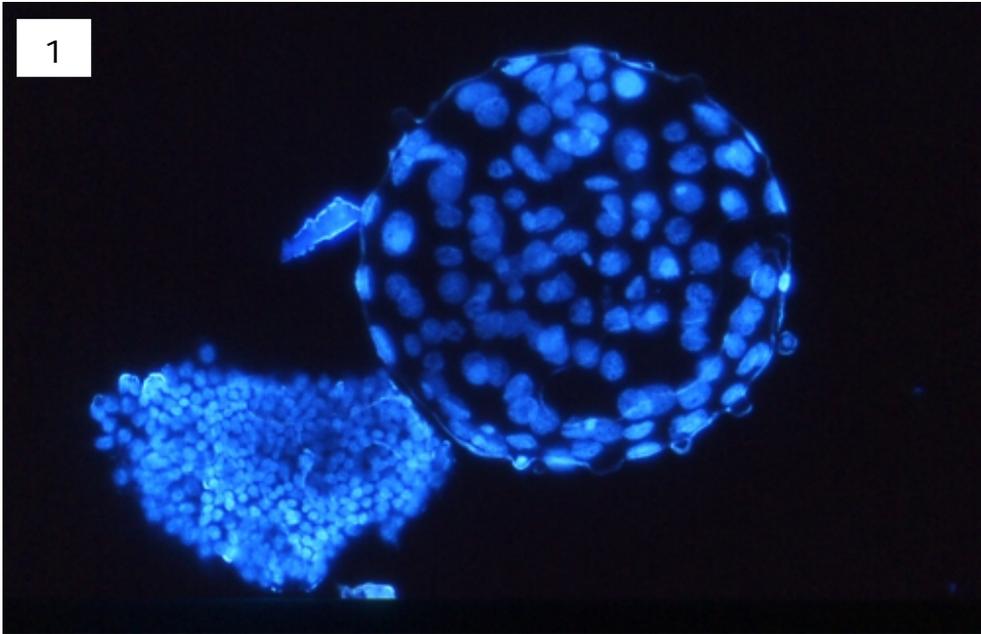
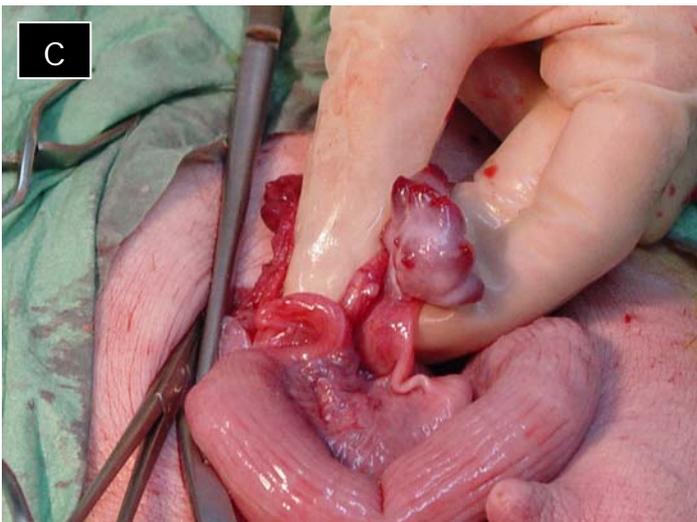
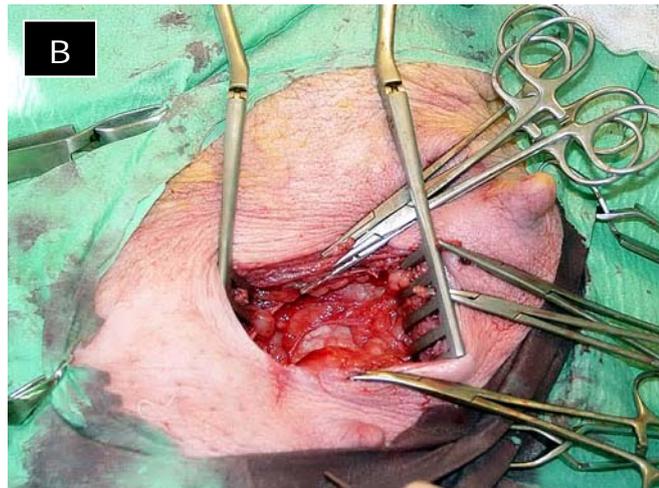


FIGURA 45. Transferencia quirúrgica de los embriones. (a) Preparación del animal para la cirugía. (b) Laparotomía ventral. Incisión en piel, subcutáneo y muscular. (c y d) Localización del cuerno uterino y exteriorización del oviducto y ovario. (e) Localización en la bolsa ovárica de la abertura del infundíbulo e introducción del catéter que portan los cigotos. (f y g) Cierre de la cavidad abdominal, fascia muscular y peritoneo. (h) Sutura de la piel.



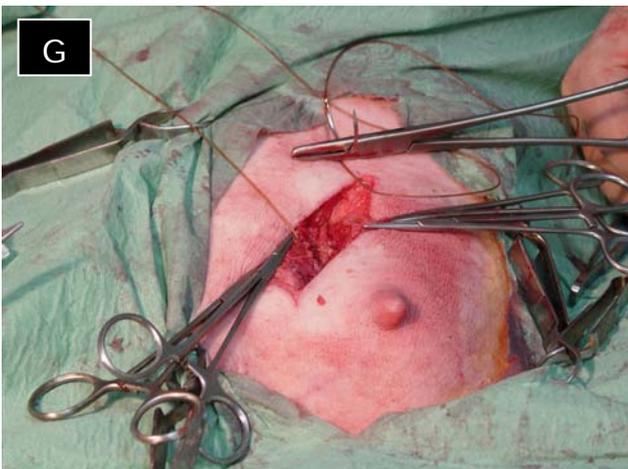
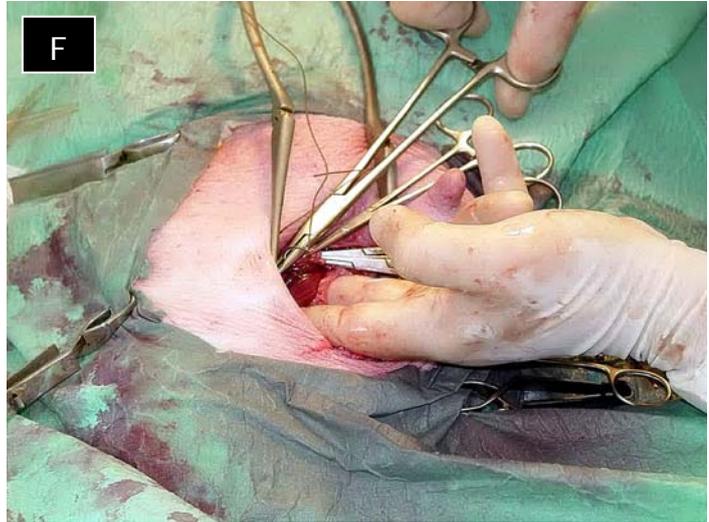
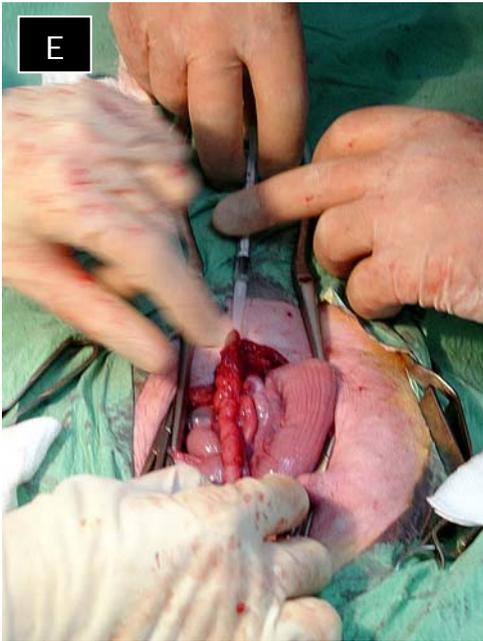
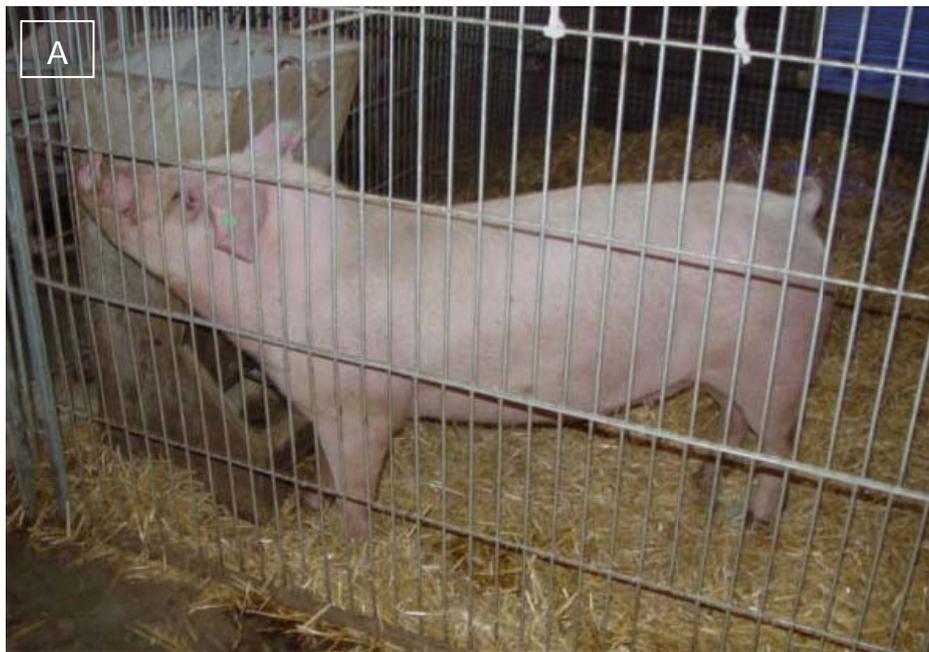
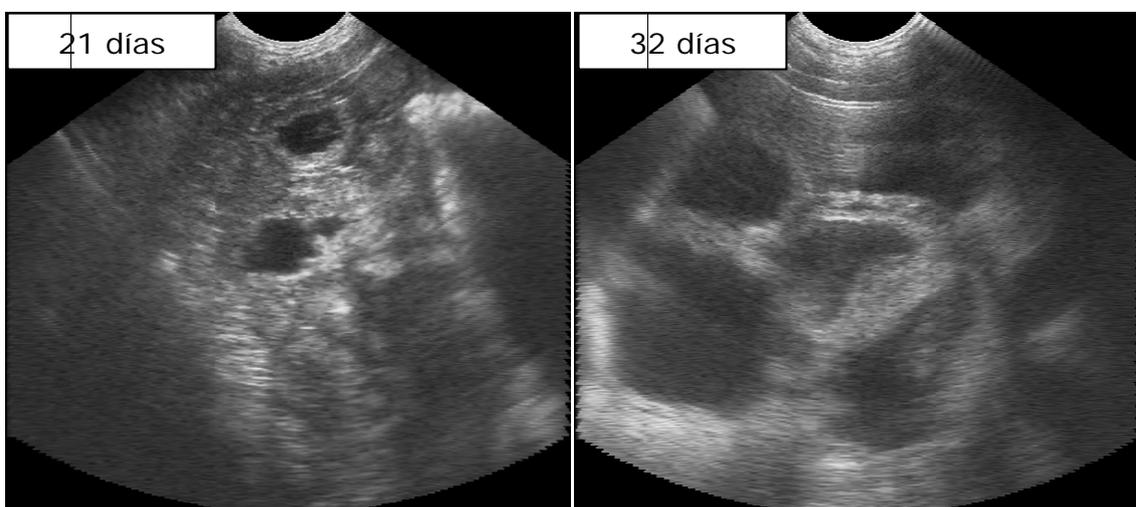
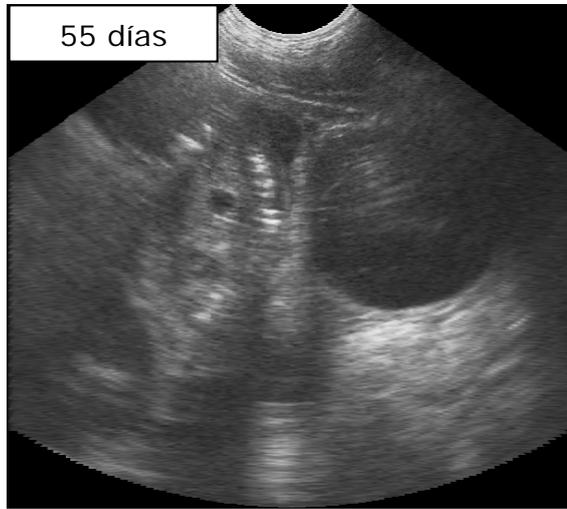


FIGURA 46. Evolución de la gestación de la cerda receptora de los embriones obtenidos por ICSI-SMGT. (a) Cerda receptora y detalle de las condiciones del alojamiento. (b) Imágenes ecográficas del útero donde se observan zonas anecógenas compatibles con las vesículas embrionarias (días 21 y 32) e imagen de las estructuras fetales en crecimiento (55 días). (c) Lechones recién nacidos a partir de la transferencia de embriones procedentes de ICSI-SMGT.



B





C



3.3.6 MANEJO DE GESTACIÓN, PARTO Y LECHONES

Los animales inseminados convencionalmente fueron alojados en jaulas individuales hasta los 25-28 días en los que se realizó el diagnóstico de gestación, para pasar entonces a parques. Las hembras intervenidas quirúrgicamente (transferencia de embriones e inseminaciones quirúrgicas) fueron alojadas individualmente en parques desde un principio. Las medidas sanitarias de alojamiento, nutrición y medioambientales fueron las habituales en las granjas comerciales de producción porcina.

Una semana antes de la fecha prevista de parto, las cerdas fueron trasladadas a la paridera. Dos días antes del parto se mantuvieron únicamente con alimento fibroso para limpiar el tracto intestinal y evitar el crecimiento bacteriano. Se conectaron placas y lámparas calefactoras 48 h antes del parto para evitar la muerte por hipotermia. Tras el nacimiento se cortó y desinfectó (*Betadine*[®], Lab Sarget Tecnodial S.A., Madrid) el cordón umbilical de los lechones y se inyectó solución de hierro 1-1.5 ml (*Ferroval*[®], Lab Medvet, Lleida, España) para evitar la anemia ferropénica. Se identificaron mediante un doble crotal numerado.

3.3.7 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y BIOPSIAS EN LOS LECHONES VIVOS

Para la obtención de las distintas muestras de tejidos de los lechones nacidos vivos se llevaron a cabo diferentes técnicas que se detallan a continuación:

3.3.7.1 Laparotomía

El animal fue conectado a la máquina de anestesia mediante el uso de una mascarilla inhalatoria, manteniendo el plano anestésico con isoflurano (*Isoflo*[®], Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona) vaporizado en oxígeno al 2-3%. Los animales, una vez anestesiados, se dispusieron en decúbito supino y fueron inmovilizados sobre la mesa de operaciones.

La técnica de laparotomía (apertura y cierre de la cavidad abdominal) se realizó del mismo modo que el descrito en el apartado 3.3.5.2. Con este método

se accedió a la cavidad abdominal donde se localizó el hígado y se seccionó una pequeña porción. Se empleó un bisturí eléctrico para la coagulación y cauterización de la herida realizada en el hígado.

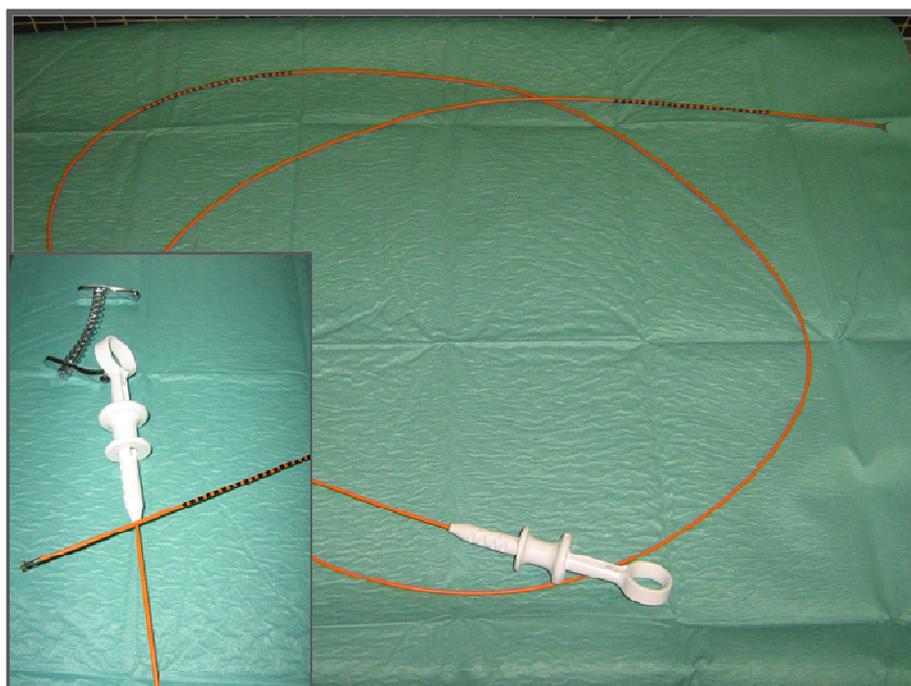
Tras la intervención quirúrgica se administró para la analgesia buprenorfina (0.3 mg/ml) 0.01 mg/kg i.m. (*Buprex*[®], Schering-Plough, S.A., Madrid) cada 8 h durante 3-4 días y se hizo un tratamiento antibiótico de cobertura (*Bivamox*[®] Boehringer Ingelheim S.A., Barcelona, España).

3.3.7.2 Pinzas de biopsia endoscópica

Para la recogida de otras muestras de tejido por la vía digestiva y respiratoria se utilizaron unas pinzas de biopsia endoscópica con forma de cuchara, circulares con diente, de 120 cm de longitud y un diámetro de 2.2 mm (*Ver figura 47*) que se aplicaron en los animales anestesiados. Con este tipo de sonda se realizaron la siguiente toma de muestras:

- Endoscopia digestiva alta: obtención de muestra de mucosa oral.
- Endoscopia digestiva baja: obtención de mucosa intestinal (recto y colon).
- Endoscopia nasal: obtención de muestra de mucosa nasal.

FIGURA 47. Sistema de endoscopia utilizado para la obtención de biopsias en los lechones.



3.3.7.3 Agujas de biopsia

Se tomó una muestra de músculo mediante el uso de aguja de biopsia de 14 G y 20 mm de profundidad (Vet-Core Biopsy Needle, Michigan, EE.UU).

3.3.7.4 Otras muestras

Otras muestras obtenidas fueron sangre, y porciones de cola y oreja. La muestras de sangre fueron obtenidas de la vena coxígea. Mientras que las muestras de tejidos de cola y oreja se obtuvieron mediante un corte directo empleando una tijera.

3.3.8 EVALUACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL ADN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (EGFP)

3.3.8.1 Integración del ADN (EGFP)

La evidencia directa de la integración del gen se realizó mediante la extracción de ADN genómico de diferentes tejidos de los lechones obtenidos para análisis por PCR. El protocolo utilizado para la extracción del ADN fue el que se detalla a continuación:

- 1) Obtener la muestra de tejido a estudiar.
- 2) Añadir 700 µl de solución de lisis (*Tabla 19*) en un tubo eppendorf.
- 3) Poner el tejido en hielo y con una cuchilla cortar la muestra de tejido lo más fino posible y pasarlo a la solución de lisis disgregándolo totalmente con tijeras.
- 4) Añadir 100 µl de proteinasa K de una solución 10 mg/ml en CaCl₂ 2 mM.
- 5) Poner en incubador o en baño a 55°C.
- 6) Al cabo de 2 h añadir otros 50 µl de proteinasa K y dejarlo incubar 12 h.
- 7) Transcurrido este tiempo, extraer el ADN genómico con fenol hasta que quede el sobrenadante limpio de proteínas.
- 8) Extraer el fenol con cloroformo y mantener el sobrenadante.
- 9) Añadir 10% de Acetato de sodio (3 M) y 1 ml (ó hasta llenar el tubo eppendorf de 2.2 ml) de etanol 100% frío.
- 10) Pasarlo a -20°C hasta precipitación total.

- 11) Centrifugar 15-30 min a 4°C.
- 12) Lavar con etanol 70%.
- 13) Secar en centrifuga de vacío "Savant" y resuspender en 100 µl de agua.
- 14) Dejar la muestra 10 min a 42°C.
- 15) Utilizar 1 µl de la muestra diluida de 1/25 a 1/100.

TABLA 19. Solución de lisis.

Componente	Concentración (ml)
5 M NaCl (150mM)	1.5
10% SDS (0.5%)	2.5
1 M Tris-HCl (25 mM)	1.25
0.5 M EDTA (10 mM)	1
H₂O	hasta 50 ml (43.75 ml)

A continuación, se procedió a realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de EGFP. Una vez purificado el ADN se cuantificó su concentración en el espectrofotómetro. Del ADN purificado fueron utilizados entre 50-100 ng para la PCR de EGFP. Los primers utilizados son GFP-1 (5'-TGA ACC GCA TCG AGC TGA AGG G-3') y GFP-2 (5'-TCC AGC AGG ACC ATG TGA TCG C-3'), que amplifican específicamente un fragmento de 340 pares de bases del ADN de EGFP. La amplificación se realizó en un volumen total de 25 µl, utilizando 1U de *Taq polymerase* (Promega®), 2.5 µl de 10X buffer, 100 µM dNTP, 0.10 M de cada primer y 1.5 mM MgCl₂. Los ciclos de la PCR consisten en un primer ciclo de desnaturalizaron de 92°C (2 min), seguido de 30 ciclos de 92°C (30 seg), 59°C (30 seg) y 72°C (30 seg). Además, un ciclo final de extensión de 5 min. El producto de la PCR se resuelve en un gel de agarosa al 1.5% en TBE buffer, posteriormente el gel se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza bajo luz ultravioleta la presencia del gen. Se utilizaron controles positivo (ADN de ratones transgénicos para EGFP) y negativo (ADN de cerdo control) en cada PCR. Además cada muestra se amplificaba con primers para ZFX/ZFY para confirmar la calidad de cada muestra (Gutiérrez-Adán *et al.* 1996).

3.3.8.2 Expresión de la EGFP

(1) Visualización directa

Para evidenciar la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP) tanto para los embriones recolectados (inseminaciones quirúrgicas) como para los lechones nacidos (inseminaciones no quirúrgicas y transferencia de embriones), se realizó una visualización directa mediante iluminación con luz azul a una excitación máxima de 488 nm de longitud de onda, ya sea mediante el uso del microscopio invertido de fluorescencia (para el caso de los embriones y folículos pilosos de los lechones) o mediante una lámpara manual que emite luz UV (para el caso de los lechones), tal y como se muestra en la *figura 43C*.

(2) *Western Blot*

En primer lugar, homogenizamos la muestra de tejido y se prepara un gel de electroforesis para separar proteínas desnaturalizadas de la masa. Las proteínas son transferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa, donde son examinadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína. Finalmente se realiza el revelado de la muestra. A continuación se describen detalladamente los pasos a seguir:

(a) Homogeneización de las muestras

Las muestras de tejidos se homogeneizaron utilizando el sistema *Kinemática Polytron*[®] PT 10/35 (Kinematica AG, Switzerland). La homogeneización se realizó en un baño de hielo evitando así el calentamiento de la muestra por fricción. Posteriormente, se pesaron 50 µgr de la muestra a los que se les añadió 500 µl de una solución compuesta por 10 ml de PBS y una pastilla inhibidora de proteasas (Complete, EDTA-free, *Roche*[®]). Se centrifugó dicha solución y se recogieron 20 µl del sobrenadante donde se añadieron 5 µl del buffer simple en condiciones reductoras [5% β-mercaptoetanol (vol/vol)] (*Tabla 20*).

TABLA 20. Buffer simple en condiciones reductoras [5% β -mercaptoetanol (vol/vol)].

Componente	Concentración
Glicerol	5 ml
SDS	0.1 gr
Tris 1.5 M	1 ml
DDT	500 μ l
5% β-mercaptoetanol	200 μ g
H₂O destilada	hasta 10 ml

Ajustar pH a 6.8

(b) Determinación de proteínas de las muestras de tejidos

Para determinar la cantidad total de proteínas en los tejidos a analizar, se utilizó el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) usando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de proteína (Smith *et al.* 1985). Ésta es una prueba empleada para la detección colorimétrica y la cuantificación de proteínas. Este método combina la reducción del ión cúprico (Cu^{+2}) a ión cuproso (Cu^{+1}) (reacción de Biuret) en un medio alcalino y la detección de este catión (Cu^{+1}) usando un reactivo que contiene el ácido bicinconínico. El producto final de la reacción es un color púrpura formado por la unión de dos moléculas de BCA con una del ion cuproso (Smith *et al.* 1985). Este complejo hidrosoluble puede ser medido mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.

1) Ensayo proteico: las muestras de los tejidos previamente homogeneizados se distribuyeron en 3 tubos de ensayo en volúmenes de 4, 8 y 12 μ l respectivamente, además como patrón y control de las muestras se utilizó BSA a una concentración conocida de 7 g/dl, y una dilución 1:1 y 1:2 de la misma. Posteriormente, se agregó a cada muestra agua ultrapura hasta completar un volumen final de 200 μ l por tubo. Para iniciar la reacción se adicionaron 2 ml del reactivo de trabajo.

Se mezcló bien y se incubó a 37°C en baño maría durante 30 minutos. Pasado este tiempo los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos e inmediatamente se realizó la lectura. Ésta se hizo rápidamente para evitar errores derivados del oscurecimiento del reactivo de la muestra. El

reactivo de trabajo para la determinación de proteínas, se preparó en el laboratorio siguiendo las indicaciones establecidas en el *Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL.), mezclando 50 volúmenes del reactivo A (incoloro) y 1 volumen del reactivo B (azul).

2) *Medición de la absorbancia*: Las muestras se midieron con la ayuda de un espectrofluorímetro *Fluostar Galaxy* (BMG Lab Technologies) excitando las muestras a 560 nm. Las muestras se colocaron, para su medición, en una placa de 96 pocillos (Nunc, Roseville Denmark) con 100 µl de volumen por pocillo.

Con los patrones se hizo una recta patrón con la que se calculó posteriormente la concentración de proteínas de las muestras en µg/µl.

(c) **Electroforesis SDS-PAGE**

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles al 10% de poliacrilamida, se utilizó un gel separador de 10% y concentrador al 10% (*Tabla 21 y 22*). Se deposita el primer gel abarcando 6 cm de los cristales del sistema, se añade una pequeña cantidad de agua formando dos fases, y de este modo evitar la entrada de oxígeno que inhibe la polimerización.

TABLA 21. Gel separador 10% (10 ml).

Componente	Concentración
H ₂ O destilada	4 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH: 8.8	2.5 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
Acrilamida-bis-Acrilamida 30%	3.3 ml
Persulfato amónico 10%	50 µl
TEMED	10 µl

TABLA 22. Gel concentrador 10% (10 ml).

Componente	Concentración
H ₂ O destilada	6.1 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH: 8.8	2.5 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
Acrilamida-bis-Acrilamida 30%	1.3 ml
Persulfato amónico 10%	50 µl
TEMED	10 µl

Una vez polimerizado el gel separador es introducido en la cubeta de desarrollo, que se llena con tampón de recorrido (*Tabla 23*). Antes de cargar las muestras preparadas en el apartado anterior se calentaron a 95°C durante 5 min. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h a 150 V, 36 mA. Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas se corrieron en paralelo las muestras estándares de peso molecular conocido (ZP3-GFP~82.2 KDa).

TABLA 23. Tampón de recorrido 10X.

Componente	Concentración (gr)
Tris 0.025 M	30
Glicina 0.192 M	144
SDS 0.1%	10
H ₂ O destilada	hasta 1000 ml

El pH final del medio debe ser 8.3

(d) Western Blot

Una vez obtenidos los geles de electroforesis se procede al análisis de EGFP mediante *Western Blot*. Se vertió el tampón de transferencia (*Tabla 24*) sobre una cubeta donde se coloca el gel de electroforesis. Antes de colocar el gel

en el sistema de transferencia, se humedecen la esponja y el papel con el buffer de transferencia, y la membrana de nitrocelulosa, de 0.45 μm de tamaño de poro, con metanol, y se arma el sistema ubicando las proteínas de carga negativa a polo positivo. Este sistema se sumerge en el buffer de transferencia y se coloca el sistema en frío (4°C) y con agitación constante. Durante 1 h a 100V, 26 mA.

TABLA 24. Tampón de transferencia.

Componente	Concentración (gr)
Glicina 39mM	2.9
Tris-base 49mM	5.8
SDS 0.037%	0.37
Metanol 20%	200 ml
H₂O destilada	hasta 1000 ml

El pH final del medio debe ser 8.3

Una vez terminada la transferencia se lavó la membrana 3 veces (10 min en cada lavado) en TBS-T 1X (TBS Tween, *Tabla 25*), posteriormente se bloquearon las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo mediante una solución compuesta de 0.1% de BSA en TBS 1X durante aproximadamente 12 h, tras lo cual se incubó con el anticuerpo primario anti-GFP [Rabbit Polyclonal anti-GFP (Abcam, Cambridge, UK)] en una dilución 1:1000 durante 1 h a temperatura ambiente. Tras esto se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en TBS 1X. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) durante 1 h (temperatura ambiente). Los estándares de peso molecular utilizados en la electroforesis sirvieron como controles negativos y ZP3-GFP como control positivo de la reacción. A continuación se realizó el revelado de la membrana.

TABLA 25. Tampón TBS-T 10X (*Western Blot*).

Componente	Concentración (gr)
NaCl 1.5 M	87.7
Tris 0.5 M (ajustar con HCl a pH = 7.5)	60.5
Tween 20 (1%)	10
H₂O destilada	hasta 1000 ml

(e) Revelado de la membrana

En primer lugar, la membrana de nitrocelulosa se colocó durante 5 min en la solución *ECL plus* [ECL Plus Western Blotting Detection System, (GE healthcare, UK)]. Posteriormente se escaneó la membrana mediante el sistema de captación de imágenes *Typhoon 9410* (Amersham Pharmacia Biotechnology Inc., Bioscience, Friburgo, Alemania).

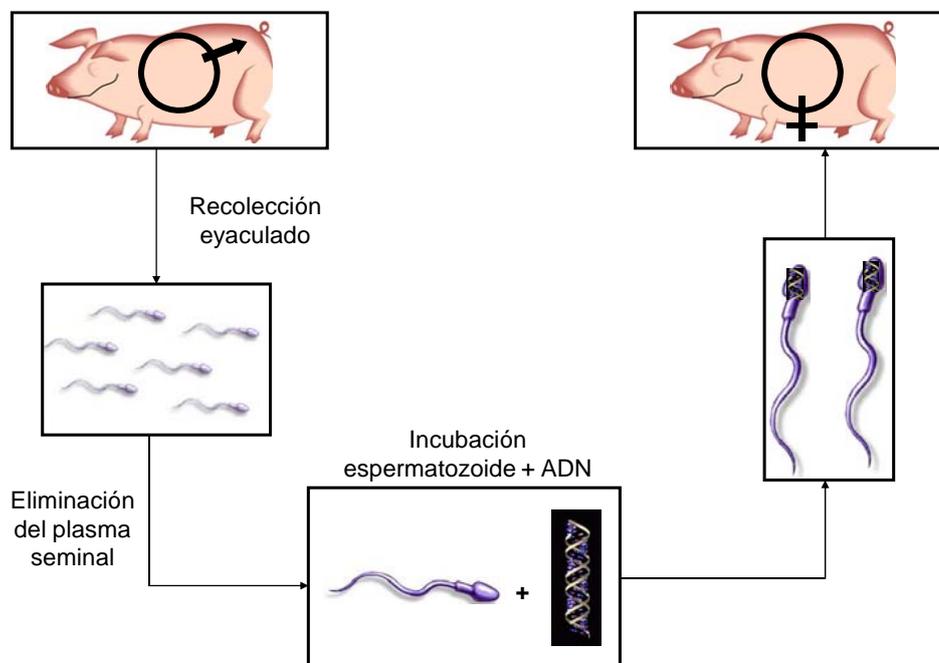
3.3.9 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Tanto las hembras utilizadas para cada una de las experiencias así como los lechones nacidos fueron sacrificados de manera humanitaria mediante la administración vía intravenosa de Pentobarbital sódico i.v. (*Dolethal*[®], Vetoquinol, Madrid). Los cadáveres fueron incinerados en las instalaciones de la Universidad de Murcia o destruidos higiénicamente en las instalaciones de la Granja Docente de la Facultad de Veterinaria. En cualquier caso siguiendo las directrices de la legislación vigente.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo fundamental de esta Tesis consistió en el desarrollo de un método eficiente de producción *in vitro* de embriones porcinos y lechones *in vivo* transgénicos aprovechando la capacidad de transferencia de ADN exógeno que presenta el espermatozoide. En todos los casos el ADN usado fue el que codifica la proteína verde fluorescente (EGFP).

FIGURA 47. Esquema de la transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina (SMGT).



Para conseguir este objetivo se diseñaron una serie de experiencias que pretenden evaluar los diversos factores que intervienen o afectan al proceso y a la eficiencia de los resultados.

El trabajo se dividió en tres experiencias que se detallan a continuación y se reflejan gráficamente en las *figuras 47 y 48*.

EXPERIENCIA 1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE GENES EXÓGENOS A LOS ESPERMATOZOIDES PORCINOS

El objetivo en esta primera experiencia fue evaluar la capacidad de los espermatozoides para transportar ADN exógeno y determinar cómo diversos factores modifican esta capacidad de unión, así como conocer el lugar de interacción ADN-espermatozoide. Para ello, se hizo uso del microscopio óptico de contraste de fases, microscopio de fluorescencia, citómetro de flujo y el microscopio electrónico como herramientas para el estudio de dicha unión.

Experiencia 1.1 Efecto de la presencia o ausencia del plasma seminal en la unión ADN-espermatozoide

(1) Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno mediante el uso de espermatozoides eyaculados

El marcado del ADN con un fluorocromo permite la evaluación de la unión del ADN con el espermatozoide mediante el uso del microscopio de fluorescencia, observando qué tratamiento es el más adecuado y si la presencia del transgén afecta a la calidad seminal. En esta experiencia se utilizaron los eyaculados de 4 machos diferentes a los que cada uno de ellos se procesó de 3 maneras distintas:

- **Grupo A:** el semen se procesó tal como se explica en el *apartado 3.1.2* (0% de plasma seminal).
- **Grupo B:** el semen recolectado se diluyó 1:10 (10% de plasma seminal) en SFM.
- **Grupo C:** el semen se diluyó 1:1 (50% de plasma seminal) en SFM.

Los espermatozoides de cada uno de estos grupos fueron coincubados con ADN (EGFP) marcado con rodamina (*pGeneGrip-Rhodamine/EGFP*, Gene Therapy System), en la relación 1×10^8 espermatozoides/ml + 5 μ g ADN/ml, durante 2 h a 16°C. Tras este periodo, a cada muestra se le añadieron 20 μ l de solución salina formolada para fijar la muestra y poder observarla al microscopio. Se contaron un mínimo de 200 células por muestra, clasificando los espermatozoides unidos o no al ADN exógeno por la presencia o no de una señal fluorescente en la superficie de la célula espermática. Se hicieron un total de 3 replicados por cada macho.

Igualmente se evaluó en los 3 grupos del apartado anterior si la presencia del ADN exógeno alteraba la calidad seminal. Para ello, se observó de cada muestra tanto la motilidad y la motilidad progresiva como la integridad de membrana valorada por la tinción DCF-IP. Dichos parámetros fueron evaluados a las 0, 1 y 2 h tras el inicio de la incubación.

(2) Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides de origen epididimario

En este apartado se comparó la unión que se establecía utilizando espermatozoides epididimarios y espermatozoides eyaculados sin plasma seminal. Los espermatozoides de ambos grupos fueron coincubados con el gen EGFP marcado con fluoresceína en la relación anteriormente indicada (*apartado 1* de esta misma experiencia). A su vez se valoró la viabilidad espermática mediante la tinción con IP. Se analizaron, mediante el citómetro de flujo, 10000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones a lo largo del tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min), a una velocidad de 500 células/segundo. Para cada medición se tomaron 100 µl de muestra a los que se le añadieron 3 ml de PBS. Las muestras fueron conservadas a 16°C durante su análisis. Se realizaron 3 replicados para esta experiencia.

Experiencia 1.2 Evaluación de la cinética de unión entre los espermatozoides y el transgén

Esta experiencia se diseñó para establecer una curva de unión entre el ADN y los espermatozoides, midiendo el porcentaje de células unidas en la muestra problema a lo largo del tiempo, tomando medidas en el citómetro tras 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min de incubación. Una vez procesado el semen (*apartado 3.1.5*), se incubó con el ADN a 16°C en la relación 1×10^8 espermatozoides/ml medio + 5 µg ADN (EGFP marcada con fluoresceína)/ml SFM. El momento en el que ponemos en contacto los espermatozoides con el ADN comienzan las mediciones en los tiempos anteriormente mencionados. Se valoró la viabilidad espermática mediante la tinción con IP. Para este experimento usamos 6 machos diferentes. Se analizaron 10000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones en cada tiempo de incubación, a una velocidad de 500 células/segundo. Para cada medición se tomaron 100 µl de muestra a los que se le añadieron 3 ml de PBS. Se evaluaron un total de 7 replicados. Para comprobar las posibles diferencias de medición entre el citómetro y el microscopio de fluorescencia comparamos el grado de unión con

ambas técnicas a las 24 h de incubación.

Experiencia 1.3 Efecto del medio de incubación de los espermatozoides con el ADN exógeno: TALP vs. SFM vs. SFM-PS

Se utilizaron dos medios diferentes para la incubación de las células espermáticas y el transgén, uno de ellos de capacitación lenta con y sin plasma seminal (SFM-PS y SFM, respectivamente), y el otro medio de capacitación rápida sin plasma seminal (TALP), estableciendo si existen diferencias con respecto a la unión del plásmido a los espermatozoides. Una vez procesado el semen (*apartado 3.1.5*), se incubó con el ADN a 16°C en la relación 1×10^8 espermatozoides/ml medio + 5 µg ADN (EGFP marcado con fluoresceína)/ml SFM o TALP. En el caso del grupo SFM-PS, se añadió a la suspensión espermática una fracción del plasma seminal (160 µl PS/ml SFM). A su vez, en todos los grupos, se valoró la viabilidad espermática utilizando la tinción con IP. Para comprobar si existía una relación entre el grado de capacitación y la capacidad de transportar ADN, se evaluó conjuntamente el desorden lipídico (Merocianina 540) de las membranas y la viabilidad espermática (Yo-Pro1) de los grupos SFM y TALP. Las muestras se analizaron mediante el citómetro de flujo, 10000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones a lo largo de 120 min de incubación (0, 15, 30, 60, 90, 120 min) en medio SFM (muestra conservada a 16°C durante su análisis) y TALP (muestra incubada a 38.5°C, 5% CO₂ durante su análisis), a una velocidad de 500 células/segundo. El número de replicados para cada uno de los grupos fue de 14 para el grupo de SFM, 3 para SFM-PS y 11 para TALP. Se utilizaron un total de 11 machos diferentes.

Experiencia 1.4 Efecto del tratamiento espermático en la interacción ADN exógeno- espermatozoide

El objetivo de esta experiencia fue comparar el grado de unión y viabilidad celular que existe entre el ADN y los espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos espermáticos:

- (1) **Intactos:** espermatozoides procesados según el protocolo descrito y sin ningún tratamiento que afecte a las membranas.
- (2) **Tratamientos físicos** de permeabilización de las membranas espermáticas mediante congelación (congelación rápida o congelación-descongelación).

- (3) **Tratamientos químicos** de permeabilización de las membranas espermáticas (Tritón X-100) y de transporte del transgén (DMSO 0.3% y DMSO 3%).
- (4) Unión entre espermatozoides y **complejos RecA:ADN**.

Las condiciones de preparación de los espermatozoides y su incubación con el ADN son las mismas que aparecen descritas en la *experiencia 1.2*. Se analizaron, mediante el citómetro de flujo, 10000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones en cada tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90, 120 min), a una velocidad de 500 células/segundo. En el apartado de congelación rápida además se comparó la unión de los espermatozoides intactos con plasma seminal. Se hicieron 9 replicados para intactos, congelación rápida, Tritón X-100, y 8 para DMSO. Para congelación-descongelación fueron 6 replicados (se preparaba una muestra heteroespérmica procedente de dos machos diferentes en cada uno de los replicados), y para el grupo RecA un total de 5 replicados. Todos los machos utilizados fueron distintos para cada uno de los replicados.

Experiencia 1.5 Efecto del tamaño del transgén sobre la unión con el espermatozoide

Se usaron dos tamaños diferentes del transgén 5.7 Kpb y 10.3 Kpb, marcados con fluoresceína con el objetivo de conocer que tamaño de ADN eran capaces de transportar los espermatozoides intactos. Del mismo modo que en la experiencia anterior se midió la unión a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120, 1440 min) estableciendo la curva de unión al espermatozoide para los dos tipos de transgén. Se analizaron, mediante el citómetro de flujo, 10000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones en cada tiempo de incubación, a una velocidad de 500 células/segundo. Se realizaron un total de 5 replicados.

Experiencia 1.6 Localización del lugar de interacción entre el transgén y el espermatozoide

El propósito de esta experiencia fue localizar en qué lugar específico del espermatozoide se unía el transgén. Para ello, el ADN utilizado había sido marcado previamente con digoxigenina (DIG) (*apartado 3.1.3*), para posteriormente ser detectado con el uso de anticuerpos anti-DIG. Se estudiaron tanto espermatozoides intactos como espermatozoides sometidos a un proceso de congelación rápida o bien congelados según el protocolo habitual empleado en nuestro laboratorio (*apartado 3.1.7*). Para este objetivo se realizaron 3

experiencias de inmunocitoquímica distintas empleando anticuerpos anti-DIG con la intención de poder evidenciar la presencia del material génico ligado o no a los espermatozoides a través de microscopía óptica (ensayo peroxidasa), microscopía de fluorescencia (ensayo Ab-FITC) y microscopía electrónica mediante un ensayo "*in toto*" y marcado del ADN-DIG mediante inmunocitoquímica con oro coloidal. Una vez marcados los espermatozoides, estos se clasificaron según la localización del ADN: 1) ADN en región acrosomal, 2) ADN en región postacrosomal, 3) ADN en región acrosomal y postacrosomal, 4) espermatozoides sin ADN unido.

(i) Ensayo de Peroxidasa (Ab-HRP): El ensayo con peroxidasa consiste en usar un anticuerpo para el antígeno digoxigenina (DIG) marcado con la HRP que genera una coloración marrón en contacto con un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno. Se evaluaron un total de 400 espermatozoides por ensayo mediante el microscopio óptico. Se realizaron 3 replicados de espermatozoides intactos, para espermatozoides congelados-descongelados 7 replicados y 3 para congelación rápida, además del control (espermatozoides no incubados con ADN y sometidos al mismo proceso de preparación que los demás grupos).

(ii) Ensayo de Fluoresceína (ab-FITC): El ensayo consiste en el empleo de anticuerpo (Ab) anti-DIG marcado con el fluorocromo fluoresceína (FITC) que permitirá ponerlo de manifiesto mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Se evaluaron un total de 400 espermatozoides por ensayo. Se realizaron 3 replicados de espermatozoides intactos, un total de 7 replicados para espermatozoides congelados-descongelados y 3 para congelación rápida, además del control (espermatozoides no incubados con ADN).

(iii) Ensayo con oro coloidal: Se procedió a marcar los espermatozoides con anticuerpos anti-DIG y finalmente se usó un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal para su posterior detección en microscopía electrónica. Se realizó una evaluación cualitativa de las muestras, de un total de 4 replicados (en cada uno de los tratamientos) de espermatozoides intactos, congelados-descongelados y de congelación rápida, además del control (espermatozoides no incubados con el ADN).

EXPERIENCIA 2. VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS

Esta experiencia se diseñó con el propósito de conocer la eficiencia de la SMGT aplicada a la producción *in vitro* de embriones transgénicos mediante FIV e ICSI utilizando diferentes tratamientos espermáticos para la obtención del mayor porcentaje de embriones transgénicos y calidad embrionaria en comparación con embriones fecundados con espermatozoides intactos incubados o no con el ADN. Esta experiencia se dividió en dos apartados:

Experiencia 2.1 Evaluación de la técnica de transgénesis espermática mediante ICSI sobre el desarrollo de embriones transgénicos

Para cada una de las subexperiencias realizadas en este apartado los espermatozoides (tras los diferentes tratamientos) se incubaron con el ADN a 16°C en la relación 1×10^8 espermatozoides/ml medio + 5 µg ADN (EGFP)/ml SFM. El tiempo mínimo de incubación previo a la ICSI fue de 30 min, para luego inyectar los espermatozoides a los ovocitos madurados durante 44 h *in vitro*. Las primeras 20-22 h post-inyección los supuestos cigotos se cultivaron en medio TALP, pasado este tiempo se traspasaron a medio de cultivo embrionario NCSU-23. Las variables estudiadas en esta experiencia se detallan a continuación:

➤ **A las 48 h post-inyección se valoró:**

- Porcentaje de división embrionaria (**% División**): se contabilizó el número de embriones en estadio de 2-4 células con respecto al total de los cigotos que iniciaron el cultivo embrionario.

➤ **A los 7 días post-fecundación se evaluó:**

- Porcentaje de blastocistos (**% Blastocistos**): se valoró como el número de blastocistos con respecto al total de embriones divididos.
- Número medio de células por blastocisto (**Nº cels/blastocisto**): se calculó como el número medio de núcleos teñidos por blastocisto.
- Porcentaje de embriones transgénicos (**% Transgénicos**): se evaluó como el número de embriones que expresaban la proteína verde fluorescente EGFP.

(1) Eficiencia de la técnica de transgénesis espermática mediante ICSI utilizando espermatozoides intactos

En primer lugar se evaluó la eficiencia de la técnica usando espermatozoides intactos (sin ningún tipo de tratamiento) libres de plasma seminal, estableciendo dos grupos: (a) espermatozoides no incubados con el transgén, (b) espermatozoides incubados con plásmidos de EGFP.

En esta experiencia se inyectaron un total de 167 ovocitos. Para el grupo control (espermatozoides sin ADN) se utilizaron 23 ovocitos y 144 para el grupo experimental (espermatozoides incubados con el ADN). Se realizaron un total de 5 replicados.

(2) Efecto de la permeabilización de las membranas espermáticas por métodos físicos: Congelación-descongelación y congelación rápida, sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

La finalidad de esta experiencia fue comprobar qué tratamiento de permeabilización de las membranas espermáticas era el más adecuado para el transporte del gen y el posterior desarrollo embrionario y la expresión de la EGFP. Para ambos grupos se estableció un grupo control de ovocitos inyectados con espermatozoides intactos incubados con el ADN.

El total de ovocitos inyectados para el grupo congelado-descongelado fue de 348, de los cuales 168 se utilizaron para el grupo control (espermatozoides intactos) y 180 se inyectaron con semen congelado, divididos en 14 replicados. Para el grupo de congelación rápida se inyectaron 206 ovocitos en total, 105 se inyectaron con espermatozoides intactos (control) y 101 con espermatozoides sometidos a un proceso de congelación rápida, en un total de 6 replicados.

(3) Efecto de la permeabilización de membranas por métodos químicos (Tritón X-100) sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

El objetivo de esta experiencia fue ver el efecto de un agente químico (Tritón X-100) sobre la permeabilización de las membranas espermáticas y su eficacia sobre el desarrollo de embriones transgénicos. Se estableció un grupo control de ovocitos inyectados con espermatozoides intactos incubados con el ADN.

Se inyectaron un total de 197 ovocitos (101 para el grupo control y 96 para el grupo Tritón X-100) divididos en 6 replicados.

(4) Efecto del uso de la recombinasa RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

Esta experiencia fue realizada para comprobar el efecto de la recombinasa, denominada RecA, sobre la mejora en la producción de embriones transgénicos. RecA fue incubada con el transgén (EGFP) y luego este complejo formado RecA:ADN se incubó con los espermatozoides. Éstos se utilizaron para fecundar los ovocitos mediante ICSI. Al igual que en la experiencia anterior se estableció un grupo control (espermatozoides intactos incubados con el ADN).

Se hicieron 9 replicados con un total de 248 ovocitos inyectados (Intactos: 117, y para RecA: 131).

Experiencia 2.2 Evaluación de la técnica de transgénesis espermática mediante FIV utilizando semen intacto. Efecto del uso de la proteína RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por FIV

Nos planteamos dos objetivos principales en esta experiencia. En primer lugar se evaluó la eficiencia de la técnica usando espermatozoides intactos (sin ningún tipo de tratamiento) libres de plasma seminal, y en segundo lugar se pretendió evaluar la eficiencia de la recombinasa RecA sobre la producción de embriones transgénicos mediante FIV. Para ello se establecieron tres grupos experimentales: (a) espermatozoides no incubados con el transgén, (b) espermatozoides incubados con plásmidos de EGFP, (c) espermatozoides incubados con complejos RecA:EGFP, para finalmente fecundar por FIV los ovocitos madurados *in vitro*. Los embriones se valoraron del mismo modo que en las experiencias anteriores (porcentaje de división, nº blastocistos, nº células por blastocisto, % embriones transgénicos).

Se utilizaron un total de 584 ovocitos, de los cuales 59 se fecundaron con espermatozoides no incubados con el ADN (control), 382 se usaron para el grupo de espermatozoides intactos incubados con el transgén, y los restantes 143, para el grupo RecA. Se hicieron un total de 4 replicados.

EXPERIENCIA 3. VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IN VIVO DE EMBRIONES Y LECHONES TRANSGÉNICOS

Esta experiencia fue realizada para valorar la obtención *in vivo* de embriones y lechones transgénicos mediante diferentes técnicas, utilizando los conocimientos adquiridos en las experiencias anteriores. Se dividió a su vez en 3 subexperiencias:

Experiencia 3.1 Obtención de lechones transgénicos por inseminación intrauterina profunda

Se inseminaron 4 cerdas multíparas mediante una sonda de inseminación intrauterina profunda, con semen incubado con ADN exógeno, que se preparó en la siguiente relación: 1000×10^6 espermatozoides/250 μ l ADN (EGFP 200 ng/ μ l) en un volumen total de 10 ml SFM/BSA. Se dejó incubando esta suspensión a 16°C durante 2 h. Tras el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía a los 25-28 días tras la inseminación, las hembras fueron llevadas a término. A los lechones obtenidos se les evaluó:

- Estado anatómico-fisiológico.
- Expresión del gen: Visualización directa de la EGFP mediante una lámpara de fluorescencia UV.
- Integración del gen: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los tejidos analizados para la integración del transgén mediante PCR procedían de cola y oreja. Se hicieron controles positivos y negativos de PCR para EGFP.

Experiencia 3.2 Obtención de embriones transgénicos por inseminación intrauterina quirúrgica

En esta experiencia se usaron hembras nulíparas, a las que se indujo la ovulación y fecundación, mediante inseminación intrauterina quirúrgica depositando los espermatozoides incubados con el transgén próximos al lugar de fecundación. De este modo disminuyen la posible competencia existente entre aquellos espermatozoides que llevan el transgén de los que no. A los 6-7 días post-inseminación se llevó a cabo la recogida de embriones, donde se valoró:

- N° cuerpos lúteos por ovario.
- Ratio cuerpos lúteos/embriones recogidos.
- Porcentaje de embriones que expresan la EGFP.
- Porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.

Esta experiencia se realizó en un total de 4 hembras prepúberes, sometidas a 2 intervenciones quirúrgicas cada una de ellas, una para la inseminación intrauterina y otra para la recogida de embriones.

Experiencia 3.3 Obtención de lechones transgénicos por transferencia quirúrgica de embriones

Se transfirieron embriones fecundados por ICSI con espermatozoides incubados con RecA:ADN, dado que en la *experiencia 2* fue el que mejor resultados ofreció en relación al porcentaje de embriones transgénicos y con un desarrollo embrionario similar al grupo control. Un total de 412 ovocitos inyectados (95-113 ovocitos por receptora) fueron transferidos quirúrgicamente en los oviductos de 4 hembras prepúberes. A los 25-28 días tras la transferencia de embriones se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía. A los lechones nacidos se les evaluó:

- Estado anatómico-fisiológico.
- Expresión del gen:
 - (a) Visualización directa de la EGFP mediante una lámpara de fluorescencia UV.
 - (b) *Western Blot* de muestras de tejidos procedentes de los lechones nacidos muertos (hígado, riñón, cerebro, piel, músculo esquelético, pulmón, corazón, estómago, intestino y paquete vascular). Previamente se determinó la cantidad de proteínas totales (BCA) de cada muestra. Se hicieron controles positivos mediante ZP3-GFP.
- Integración del gen: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

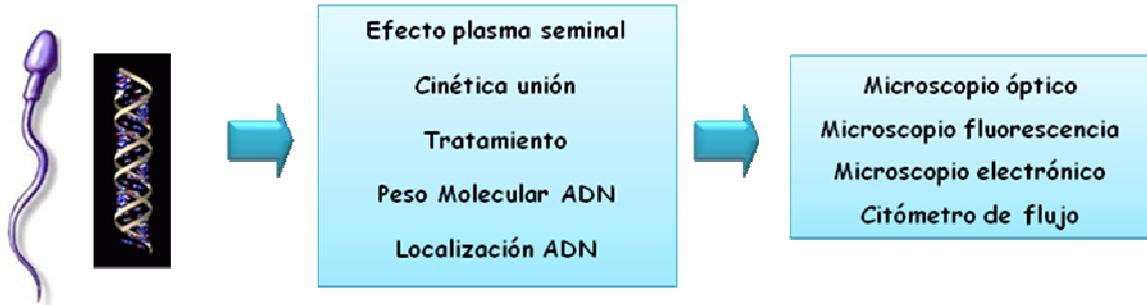
Los tejidos analizados para la integración del transgén mediante PCR fueron:

- (1) Para los **lechones nacidos muertos**: hígado, riñón, cerebro, piel, músculo esquelético, pulmón, corazón, testículo/ovario, bazo, estómago, intestino y paquete vascular.

- (2) Para los **lechones nacidos vivos**: las diferentes muestras y biopsias fueron recogidas:
- A los 1-7 días de edad: cola, oreja, sangre, músculo esquelético.
 - A los 21-28 días de edad: mucosa intestinal, oral y nasal.
 - A los 40 días de edad: hígado.
 - A los 120 días de edad: sangre.
- (3) **Controles negativos** de lechones obtenidos mediante inseminación artificial convencional (espermatozoides sin ADN exógeno).
- (4) **Controles positivos** de ratones transgénicos para EGFP.

FIGURA 48. DISEÑO EXPERIMENTAL

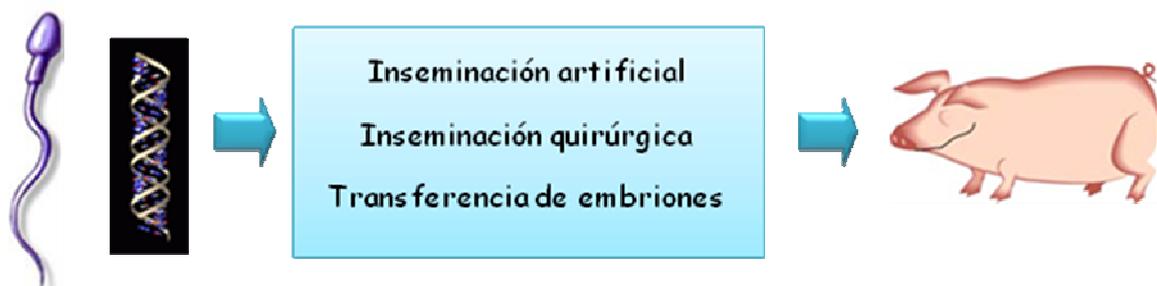
EXPERIENCIA 1. Evaluación de la capacidad de transferencia de genes exógenos en los espermatozoides porcinos



EXPERIENCIA 2. Valoración de la producción *in vitro* de embriones transgénicos mediante FIV e ICSI



EXPERIENCIA 3. Valoración de la producción *in vivo* de embriones y lechones transgénicos



3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las variables estudiadas se expresan como medias \pm error estándar de la media (SEM).

Para todo el estudio estadístico se utilizó el programa *Systat v11* (Systat Software Inc., 2004. Richmond, CA 94804. USA). De forma general se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con una transformación previa de los porcentajes según el modelo binomial de parámetros en el caso de las variables categóricas (% de división, % de blastocistos). Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el Test de *Tukey*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad de $p < 0.05$.

En las diversas experiencias del **apartado 1** (estudios de unión del ADN y los espermatozoides) se utilizaron modelos de ANOVA de dos vías donde se incluía el macho y el tratamiento espermático o bien el tratamiento espermático y el tiempo de incubación como factores principales. En la *experiencia 4.1.3* se aplicó un análisis de correlación de *Pearson*.

En las experiencias de los **apartados 2 y 3** (producción *in vitro* de embriones transgénicos y producción *in vivo* de embriones y lechones transgénicos) se aplicó un modelo de ANOVA de una vía, donde el tratamiento espermático fue el factor principal.

4

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada una de las experiencias del presente trabajo se muestran a continuación.

4.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE ADN EXÓGENO A LOS ESPERMATOZOIDES PORCINOS

4.1.1 Efecto de la presencia o ausencia del plasma seminal en la unión espermatozoide-ADN exógeno

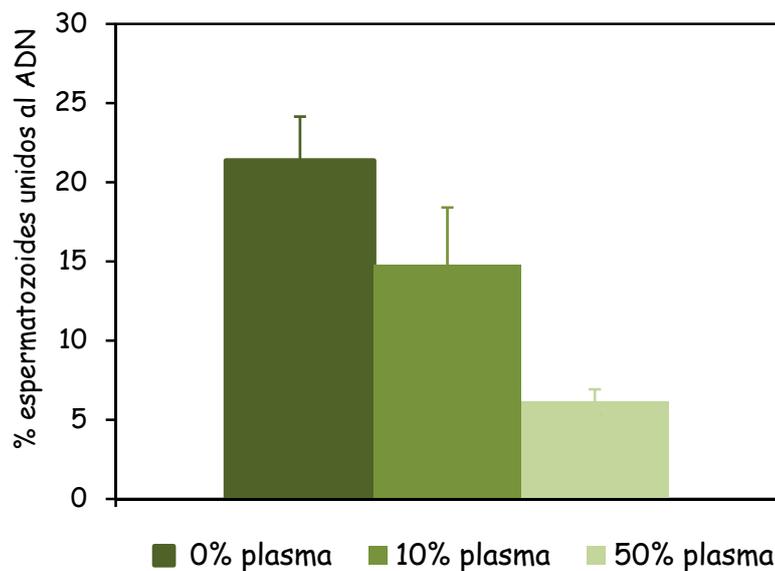
4.1.1.1 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno mediante el uso de espermatozoides eyaculados

El grado de unión de los espermatozoides al ADN se evaluó en tres grupos experimentales en presencia de 50%, 10% de plasma seminal y en ausencia del mismo.

Los resultados muestran que la presencia del plasma seminal influyó en el porcentaje de espermatozoides unidos al ADN ($p < 0.01$). De manera que en términos globales, el grupo control (0% de plasma seminal) presentó un mayor porcentaje de unión que el grupo que presentaba el 50% de plasma, mientras

que el grupo con el 10% de plasma se mantuvo en una situación intermedia (21.35 ± 3.43 vs. 14.78 ± 4.49 vs. $6.13 \pm 0.89\%$). Estos resultados quedan reflejados en la *figura 49* y *tabla 27*.

FIGURA 49. Porcentaje de espermatozoides unidos al ADN utilizando 3 tratamientos espermáticos diferentes: incubación en presencia de 0%, 10% y 50% de plasma seminal, medidos mediante microscopía de fluorescencia.



Del mismo modo se observó que existía una diferencia significativa en el grado de unión al ADN según el macho utilizado ($p < 0.01$). Podemos observar dicho efecto al analizar los datos mostrados en la *figura 50* y *tabla 27*, donde se verifica que los espermatozoides del macho 257 presentan un mayor porcentaje de unión que los mostrados por los otros tres machos utilizados. Por otra parte, la interacción del efecto macho y de la presencia del plasma seminal en el medio de incubación no fue significativa ($p = 0.16$), lo que indica que el comportamiento de cada macho fue similar en cada uno de los diferentes tratamientos, como puede observarse en la *tabla 27*.

FIGURA 50. Porcentaje medio de espermatozoides unidos a ADN procedentes de 4 verracos diferentes medidos con el microscopio de fluorescencia.

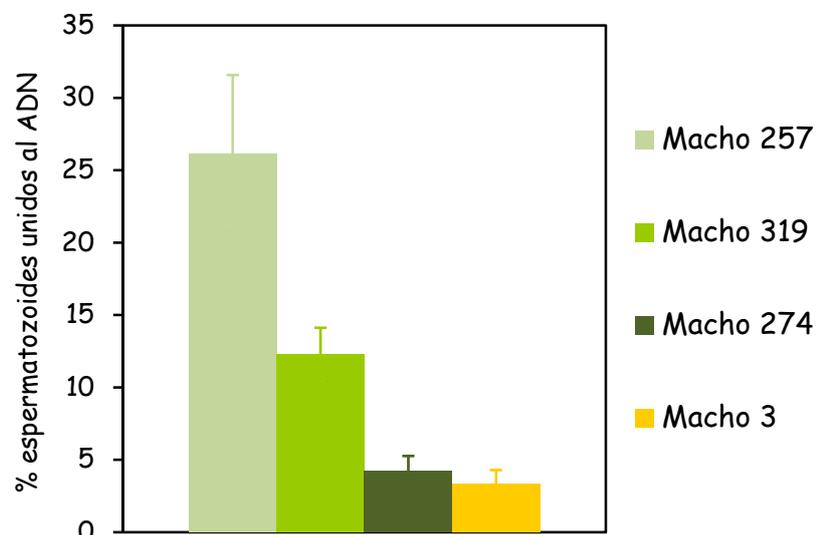


TABLA 27. Porcentaje de espermatozoides (procedentes de 4 machos distintos) unidos al ADN utilizando 3 tratamientos espermáticos diferentes: incubación en presencia de 0%, 10% y 50% de plasma seminal.

Macho	0% plasma	10% plasma	50% plasma	Valor medio
3	5.83±2.44	2.00±0.82	2.17±1.08	3.33±0.97 ^a
257	39.00±9.65	32.91±11.06	8.50±1.28	26.17±5.41 ^b
274	8.00±2.33	2.43±0.61	2.29±1.11	4.24±1.03 ^a
319	22.17±2.42	8.20±2.98	5.83±1.70	12.29±1.84 ^a
Valor medio	21.35±3.43 ^a	14.78±4.49 ^{ab}	6.13±0.89 ^b	

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 27

Fuente de Variación	Valores de p
% plasma seminal	0.01
Macho	<0.01
Interacción plasma seminal y macho	0.16

Al estudiar el efecto de la presencia del ADN durante el cocultivo sobre la calidad seminal a lo largo de 2 h, encontramos, que la presencia del ADN no afectó a ninguno de los parámetros seminales estudiados (motilidad, calidad de movimiento y viabilidad), ni tampoco la presencia de plasma seminal (Tabla 28).

Los parámetros de calidad seminal fueron decreciendo a lo largo del tiempo de incubación, presentándose diferencias significativas entre los valores medidos a las 0 y 2 h de incubación ($p < 0.01$). Finalmente debemos destacar que se encontró un efecto significativo del macho sobre los parámetros de motilidad y viabilidad evaluados ($p < 0.01$).

TABLA 28. Parámetros seminales (motilidad, motilidad progresiva y viabilidad) de espermatozoides sometidos a 3 tratamientos espermáticos diferentes: incubación en presencia de 0%, 10% y 50% de plasma seminal en presencia o ausencia de ADN exógeno. Valores tras un periodo de incubación de 2 h.

Tratamiento	Presencia ADN	Motilidad	Motilidad progresiva	Viabilidad (DCF/IP)
0% Plasma	si	72.27±1.35	2.50±0.09	81.32±0.85
0% Plasma	no	70.00±2.59	2.41±0.09	80.61±0.91
10% Plasma	si	69.55±1.77	2.32±0.10	77.30±0.93
10% Plasma	no	71.36±1.68	2.39±0.08	78.16±1.26
50% Plasma	si	73.26±1.46	2.48±0.07	83.58±0.95
50% Plasma	no	72.39±1.54	2.43±0.08	84.31±1.04

Anova Tabla 28

Fuente de Variación	Motilidad	Motilidad progresiva	Viabilidad (DCF/IP)
Presencia ADN	0.93	0.43	0.39
% plasma seminal	0.58	1.00	0.24
Interacción plasma y ADN	0.73	0.53	0.26

Al realizar un análisis de correlación lineal entre los parámetros seminales y el grado de unión de ADN, encontramos que no hay asociación significativa entre la calidad seminal de las muestras estudiadas y la capacidad de unirse al ADN.

4.1.1.2 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides de origen epididimario

Como muestran los resultados en la *tabla 29*, los espermatozoides epididimarios presentan una capacidad similar a los eyaculados y centrifugados tanto en el grado de unión al ADN como en la viabilidad a lo largo de la incubación. Únicamente detectamos un mayor porcentaje de unión del ADN a las células vivas.

TABLA 29. Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación para espermatozoides epididimarios y eyaculados sin plasma seminal.

Tipo espermatozoides	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Epididimario	14.64±0.94	12.63±1.23	10.53±1.01	2.10±0.33 ^a
Eyaculado	13.42±0.61	10.94±1.05	9.89±0.97	1.05±0.14 ^b

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 29

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo espermatozoides	0.23	0.31	0.98	<0.01
Tiempo incubación	0.02	<0.01	<0.01	<0.01
Interacción tipo espermatozoides y tiempo	0.81	0.76	0.80	0.07

4.1.2 Evaluación de la cinética de unión entre los espermatozoides y el transgén

Al estudiar el proceso de unión de los espermatozoides al ADN a lo largo del tiempo, analizado mediante el citómetro de flujo, encontramos que los resultados, en 6 machos diferentes estudiados, muestran que en los primeros 15 min de incubación tiene lugar la mayor parte de unión entre el ADN y los espermatozoides (13.80 ± 0.94), posteriormente existe un aumento gradual del porcentaje de unión hasta un máximo de 16.57 ± 1.16 a los 120 min de incubación.

Cuando estas mismas muestras se analizaron a las 24 h tanto por medio del citómetro como por medio de la observación microscópica, encontramos que aumentó significativamente el porcentaje de unión hasta 26.45 ± 1.65 en el caso del citómetro (*Tabla 30*), mientras que la observación microscópica dio un valor medio de $32.00 \pm 5.35\%$ espermatozoides unidos al ADN, sin que estas sean diferencias significativas ($p > 0.05$).

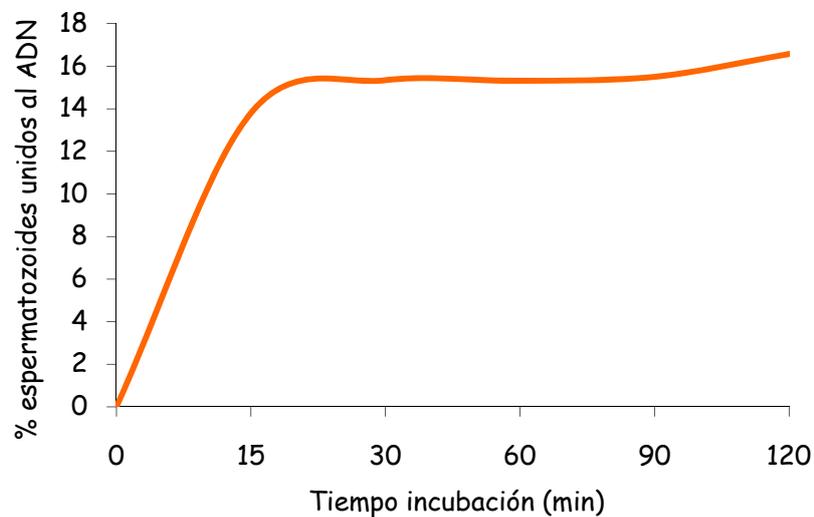
La cinética de unión que presentan los espermatozoides y el transgén se reflejan en las *figuras 51* (datos medios de unión de los machos utilizados) y *52* (comportamiento individual de cada uno de los machos estudiados).

TABLA 30. Porcentaje medio de espermatozoides (procedentes de 6 machos diferentes) unidos al ADN medidos en diferentes tiempos de incubación a lo largo de 24 h mediante citometría de flujo.

Tiempo incubación	Unión Media (%)
0 min	0 ^a
15 min	13.80±0.94 ^b
30 min	15.34±1.01 ^b
60 min	15.31±0.95 ^b
90 min	15.50±1.01 ^b
120 min	16.57±1.16 ^b
24h	26.45±1.65 ^c
P < 0.01	

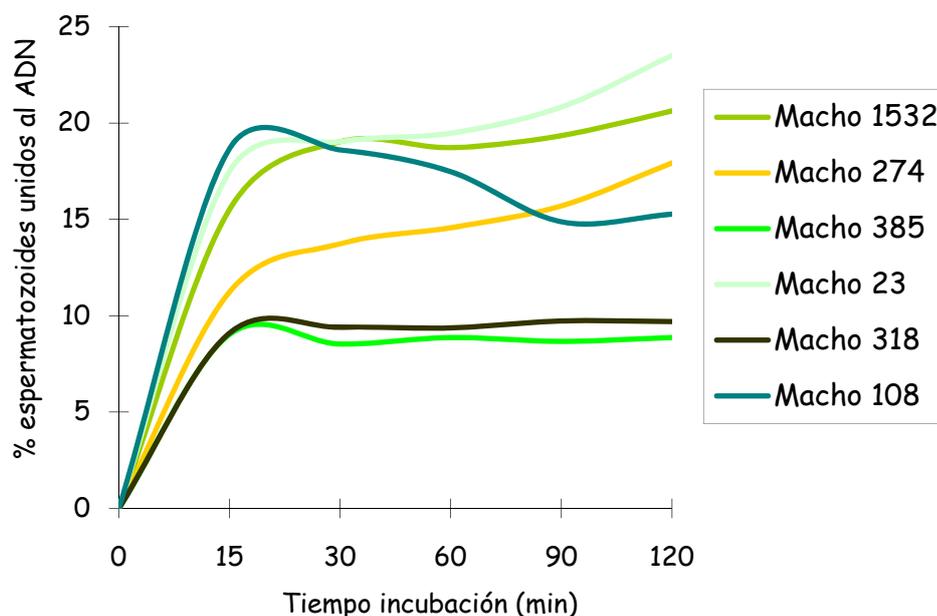
a, b, c en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

FIGURA 51. Curva de incorporación del ADN al espermatozoide a lo largo de 120 min de incubación medida por citometría de flujo (datos de unión medios de los distintos machos utilizados).



Se analizó el efecto del tiempo de incubación y del verraco usado (6 machos diferentes). Observamos que existen diferencias significativas dependiendo del macho utilizado ($p < 0.01$), y se presentaban pequeñas variaciones en el patrón de la cinética de unión a lo largo del tiempo entre los machos estudiados (interacción macho y tiempo, $p < 0.01$).

FIGURA 52. Cinética de unión entre espermatozoide y ADN a lo largo de 120 min de incubación en los 6 machos utilizados para esta experiencia.



4.1.3 Efecto del medio de incubación de los espermatozoides con el ADN exógeno: TALP vs. SFM vs. SFM-PS

Cuando los espermatozoides fueron incubados en medio TALP, que favorece la capacitación de los mismos, se observó un grado de unión al ADN mucho mayor que cuando se incubó en medio SFM (valores medios de 44.42 vs. 14.12%, $p < 0.01$). Mientras que los mismos espermatozoides que se procesaron después de estar en contacto con plasma seminal durante al menos 4 h (SFM-PS) presentaron menor grado de unión que el grupo SFM (11.50 vs. 14.12%, $p < 0.01$). Los resultados quedan reflejados en la *tabla 31*.

La unión incrementada de los espermatozoides incubados en TALP está asociada con un mayor porcentaje de muerte celular, determinada por la tinción con IP (porcentaje de células muertas mayor que el grupo SFM). No obstante,

aunque el porcentaje de células unidas a ADN y viables es en general muy reducida (<2%), en el grupo TALP es ligeramente superior que en el grupo SFM (Tabla 31). En la figura 53 se muestran los valores y cinética de unión de los espermatozoides al transgén en los 3 medios de incubación utilizados.

TABLA 31. Datos medios de unión y viabilidad, entre los espermatozoides y el plásmido, a lo largo de 120 min de incubación en diferentes medios: SFM, SFM con plasma seminal y TALP.

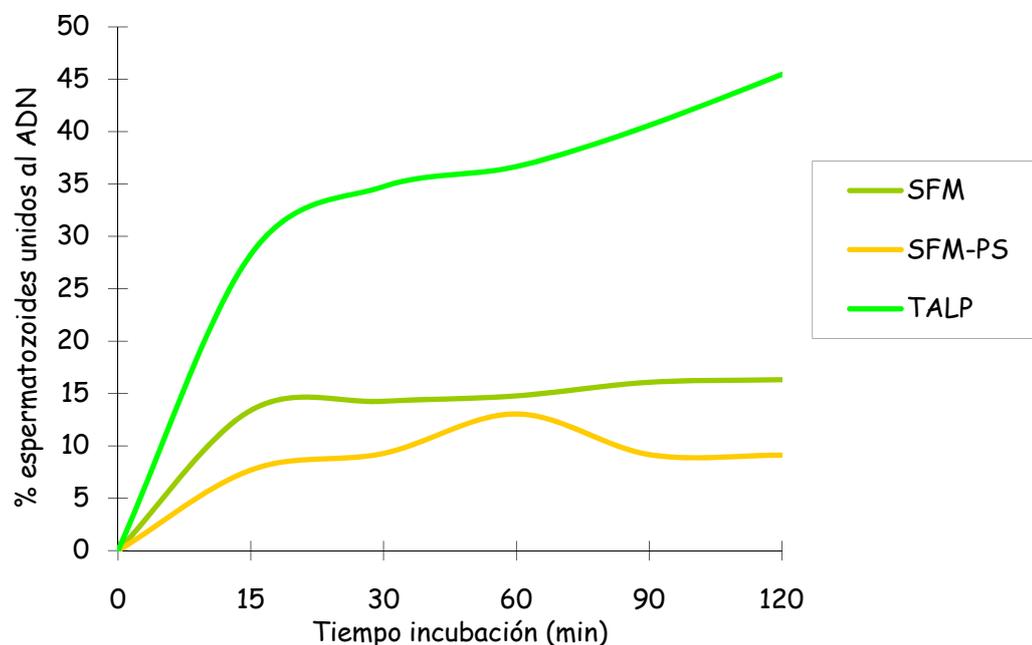
Medio de incubación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
SFM	12.88±0.43 ^a	14.12±0.85 ^a	13.57±1.09 ^a	1.01±0.07 ^a
SFM-PS	12.95±0.43 ^a	11.50±0.32 ^b	10.15±0.27 ^a	1.35±0.12 ^{ab}
TALP	45.58±2.43 ^b	44.42±2.51 ^c	42.55±2.40 ^b	1.87±0.16 ^b

^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 31

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo tratamiento	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Tiempo incubación	0.17	<0.01	<0.01	0.47
Interacción tratamiento y tiempo	0.16	0.03	0.01	0.62

FIGURA 53. Cinética de unión de los espermatozoides al transgén en los distintos medios de incubación utilizados: SFM, SFM-PS y TALP.



Para comprobar si existía una relación entre el grado de capacitación y la capacidad de transportar ADN, se evaluó conjuntamente el desorden lipídico de las membranas y la viabilidad espermática de los grupos SFM y TALP. Al analizar los datos resultantes se observó que los espermatozoides incubados en medio TALP sufrieron un aumento significativo del desorden lipídico (TALP: 21.81 ± 1.22 vs. SFM: 3.00 ± 0.25 , $p < 0.01$) y el número de espermatozoides muertos fue mayor que en el grupo SFM (Tabla 32).

TABLA 32. Datos medios de desorden lipídico y viabilidad de los espermatozoides a lo largo de 120 minutos de incubación en TALP y SFM.

Medio de incubación	Bajo desorden lipídico y spz viables	Alto desorden lipídico y spz viables	Muertos
SFM	79.24 ± 0.65^a	3.00 ± 0.25^a	17.75 ± 0.54^a
TALP	20.69 ± 1.67^b	21.81 ± 1.22^b	57.50 ± 2.09^b

^{a,b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 32

Fuente de Variación	Bajo desorden lipídico y spz viables	Alto desorden lipídico y spz viables	Muertos
Tipo tratamiento	<0.01	<0.01	<0.01
Tiempo incubación	<0.01	<0.01	<0.01
Interacción tratamiento y tiempo	<0.01	<0.01	<0.01

El análisis de correlación de *Pearson* entre el grado de unión y los parámetros de desorden lipídico y viabilidad espermática (Tabla 33), ponen de manifiesto que hay una relación directa entre la mortalidad espermática y el grado de unión, independientemente de la técnica empleada ($r=0.57$ y $r=0.53$, $p<0.01$), y una relación inversa entre el porcentaje de células de bajo desorden lipídico y el grado de unión ($r=-0.46$, $p<0.01$).

TABLA 33. Coeficiente de correlación de *Pearson* entre el % de unión de ADN y los parámetros de desorden lipídico y viabilidad.

	Correlación de <i>Pearson</i>	Probabilidad
Bajo desorden lipídico y viables	-0.46	<0.01
Muertos con tinción Yo-Pro1	0.57	<0.01
Muertos con tinción IP	0.53	<0.01

4.1.4 Efecto del tratamiento espermático en la interacción ADN exógeno-espermatozoide

4.1.4.1 Uso de espermatozoides congelados

Los espermatozoides **congelados-descongelados** presentaron una menor viabilidad (porcentaje de espermatozoides muertos 60.15 vs. 11.68, $p<0.01$) y una mayor capacidad de unión al ADN que los espermatozoides intactos (porcentaje de unión 55.08 vs. 9.67, $p<0.01$). Igualmente se detecta un

porcentaje considerable de células vivas unidas al ADN (5.80 ± 0.48) cuando se utiliza semen congelado (Tabla 34).

TABLA 34. Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación entre el transgén y espermatozoides congelados-descongelados medidos mediante citometría de flujo.

Tratamiento	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Intactos	11.68 ± 0.36^a	9.67 ± 0.62^a	8.84 ± 0.57	0.84 ± 0.08^a
Congelados-descongelados	60.15 ± 1.20^b	55.08 ± 1.79^b	49.29 ± 1.71	5.80 ± 0.48^b

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 34

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo tratamiento	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Tiempo incubación	0.16	<0.01	<0.01	0.05
Interacción tratamiento y tiempo	0.79	<0.01	<0.01	0.15

Cuando en vez de usar espermatozoides congelados y descongelados mediante un procedimiento que busca la conservación de la viabilidad, se someten a los espermatozoides a un proceso brusco de congelación (**congelación rápida**), observamos cómo disminuye drásticamente la viabilidad pero conseguimos con este proceso un grado de unión al ADN que supera el 90% (95.23 ± 0.75 , $p < 0.01$) (Tabla 35).

Del mismo modo confirmamos los resultados de experiencias previas con evaluación microscópica, donde se evidencia que la presencia del plasma seminal reduce la capacidad de unión al ADN (26.25 ± 0.79 vs. 31.92 ± 1.13 , $p < 0.01$).

TABLA 35. Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación entre el transgén y espermatozoides congelados de forma rápida medidos mediante citometría de flujo.

Tratamiento	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Intactos	31.27±1.09 ^a	31.92±1.13 ^a	30.71±1.11 ^a	1.38±0.06 ^a
Intactos (PS)	24.41±0.74 ^b	26.25±0.79 ^b	23.74±0.77 ^b	2.51±0.11 ^b
Congelación rápida	95.23±0.75 ^c	93.76±1.32 ^c	92.44±1.09 ^c	2.33±0.13 ^b

^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 35

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo tratamiento	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Tiempo incubación	0.92	0.03	0.01	0.51
Interacción tratamiento y tiempo	0.96	0.96	0.87	0.95

4.1.4.2 Uso de espermatozoides tratados con Tritón X-100

El tratamiento con Tritón X-100 supone una inmediata alteración de la estructura de la membrana (96.42% de células muertas) que lleva asociado un alto grado de unión de los espermatozoides con el ADN (90.50 ± 1.11). Los datos de porcentaje de unión a células vivas nos proporcionan valores similares tanto en el grupo de Tritón X-100 como en el grupo de espermatozoides intactos (1.69 ± 0.23 vs. 1.38 ± 0.06). Tales resultados se reflejan en la *tabla 36*.

TABLA 36. Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación para espermatozoides tratados con Tritón X-100.

Tratamiento	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Intactos	31.44±1.09 ^a	32.09±1.12 ^a	30.71±1.11 ^a	1.38±0.06
Tritón X-100	96.42±0.43 ^b	90.50±1.11 ^b	88.80±1.16 ^b	1.69±0.23

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 36

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo tratamiento	<0.01	<0.01	<0.01	0.15
Tiempo incubación	0.70	0.82	0.74	0.09
Interacción tratamiento y tiempo	0.97	0.99	0.97	0.05

4.1.4.3 Uso de espermatozoides tratados con DMSO

Los espermatozoides tratados con DMSO al 3% presentaron una viabilidad espermática significativamente menor que la del control, mientras que el grupo DMSO a la concentración del 0.3% se mantuvo en una posición intermedia. Del mismo modo, fue distinta la capacidad de unirse al ADN exógeno.

Las muestras del grupo de espermatozoides intactos (control) presentaron una viabilidad disminuida frente al grupo de DMSO al 3% (34.87 ± 0.97 vs. 31.34 ± 0.98), así como una mayor capacidad de unión al ADN (35.76 ± 0.98 vs. 31.95 ± 0.97). Además la unión fue diferente en el grupo de espermatozoides intactos, donde se encontró un mayor porcentaje de células muertas y unidas al ADN (34.36 ± 0.97) y una menor proporción de células viables y unidas al ADN (1.40 ± 0.06) que en los dos grupos restantes. Los valores para el grupo DMSO 0.3%, en todos los parámetros analizados, se encontraban en valores intermedios entre los presentados por el grupo de espermatozoides intactos y tratados con DMSO al 3% (Tabla 37).

TABLA 37. Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación para espermatozoides tratados con DMSO.

Tratamiento	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Intactos	34.87±0.97 ^a	35.76±0.98 ^a	34.36±0.97 ^a	1.40±0.06 ^a
DMSO 0.3%	31.95±0.93 ^{ab}	32.97±0.94 ^{ab}	31.35±0.95 ^{ab}	1.62±0.06 ^b
DMSO 3%	31.34±0.98 ^b	31.95±0.97 ^b	30.11±0.97 ^b	1.84±0.07 ^c

^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 37

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo tratamiento	0.02	0.02	0.01	<0.01
Tiempo incubación	0.17	0.23	0.18	0.01
Interacción tratamiento y tiempo	1.00	1.00	1.00	0.94

4.1.4.4 Uso de espermatozoides incubados con complejos RecA:ADN

La incubación en presencia de la recombinasa RecA supuso un aumento del porcentaje de células muertas (26.60 ± 0.46 vs. 22.48 ± 0.63), y al mismo tiempo un aumento del porcentaje de células unidas al ADN (24.69 ± 0.70 vs. 19.68 ± 0.73) con respecto a espermatozoides intactos incubados únicamente con el gen EGFP. Los resultados se muestran en la *tabla 38*.

TABLA 38. Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación para espermatozoides incubados a su vez con los complejos RecA:ADN.

Tratamiento	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Intactos	22.48±0.63 ^a	19.68±0.73 ^a	19.21±0.71 ^a	0.47±0.09
RecA	26.60±0.46 ^b	24.69±0.70 ^b	24.11±0.69 ^b	0.58±0.09

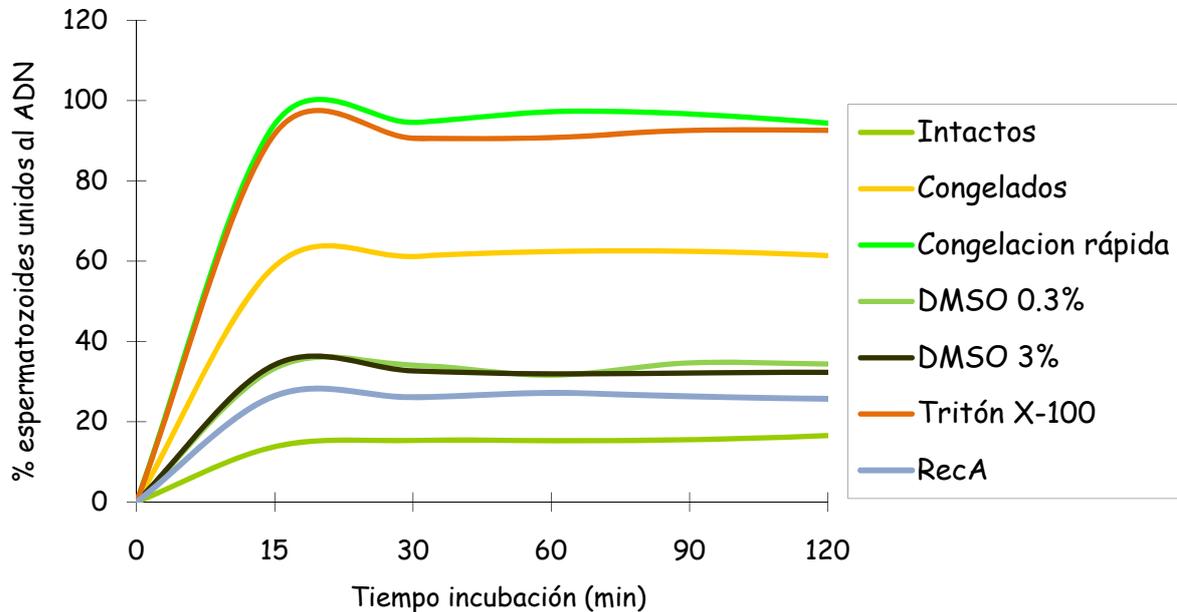
^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 38

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo tratamiento	<0.01	<0.01	<0.01	0.40
Tiempo incubación	0.66	<0.01	<0.01	0.21
Interacción tratamiento y tiempo	0.92	0.92	0.86	0.47

A modo de resumen, en la *figura 54* queda representada la cinética de unión entre los espermatozoides y el ADN en las diferentes experiencias llevadas a cabo (*apartados 4.1.2 y 4.1.4*). Observamos en todos los casos que la cinética de unión es similar independientemente del tratamiento utilizado, no obstante el mayor porcentaje de unión se produce en los primeros 15 min de incubación, a partir de este tiempo la unión permanece constante hasta los 120 min de cocultivo. El mayor porcentaje de unión tiene lugar al tratar los espermatozoides con Tritón X-100 y con congelación rápida.

FIGURA 54. Cinética de unión entre el transgén y los espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos a lo largo del tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min).



4.1.5 Efecto del tamaño del transgén sobre la unión con el espermatozoide

Al evaluar el uso de ADN de diferente tamaño (5.7 vs. 10.3 Kpb) los resultados muestran que no existe un efecto significativo en los parámetros estudiados (viabilidad y capacidad de unión al ADN) asociados al tamaño del transgén utilizado (*Ver tabla 39 y figura 55*). Así los espermatozoides porcinos analizados tienen la misma capacidad de unión al ADN, tanto a los espermatozoides vivos como a los muertos ($p > 0.05$).

Por otra parte, la utilización de ADN de distintos pesos moleculares no incide en la viabilidad espermática, que desciende conforme aumenta el tiempo de incubación.

Como se describía en el apartado anterior el periodo de incubación afecta tanto al grado de unión como a la viabilidad ($p < 0.01$), aumentando el porcentaje de unión rápidamente en los primeros 15 min de incubación en ambos grupos mientras que el aumento gradual en los siguientes periodos de incubación no fue significativo.

TABLA 39. Valores de viabilidad y capacidad de unión entre espermatozoides y ADN exógeno de dos pesos moleculares diferentes (5.7 Kpb y 10.3 Kpb) medidos en diferentes tiempos de incubación [hasta 1440 min (24 h)] mediante citometría de flujo.

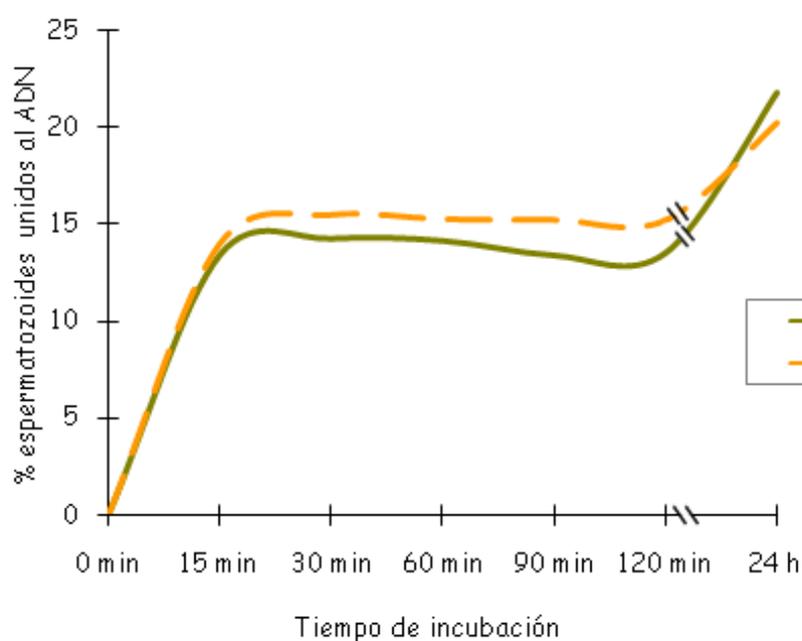
ADN	Tiempo (min)	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
5.7 Kpb	0	11.66±1.02 ^a	-	-	-
5.7 Kpb	15	14.10±0.98 ^a	13.43±0.74 ^a	11.43±0.98 ^a	1.40±0.31
5.7 Kpb	30	14.40±1.17 ^a	14.27±0.88 ^a	12.00±0.89 ^a	1.22±0.21
5.7 Kpb	60	14.22±1.29 ^a	14.16±1.05 ^a	12.09±1.03 ^a	1.41±1.07
5.7 Kpb	90	14.30±1.23 ^a	13.41±1.11 ^a	12.32±0.97 ^a	1.70±0.82
5.7 Kpb	120	13.96±1.27 ^a	13.53±1.26 ^a	11.60±1.14 ^a	1.93±0.57
5.7 Kpb	1440	21.80±2.2 ^b	23.07±2.1 ^b	20.19±2.33 ^b	0.83±0.22
10.3 Kpb	0	10.33±1.29 ^a	-	-	-
10.3 Kpb	15	13.61±1.36 ^{ab}	13.97±0.77 ^a	10.63±0.73 ^a	2.40±0.18
10.3 Kpb	30	14.50±1.43 ^{ab}	15.45±1.08 ^a	11.40±0.80 ^a	2.41±0.60
10.3 Kpb	60	14.45±1.51 ^{ab}	15.23±0.93 ^a	12.38±0.91 ^a	1.25±0.30
10.3 Kpb	90	14.78±1.18 ^{ab}	15.19±0.92 ^a	12.76±0.93 ^a	0.82±0.29
10.3 Kpb	120	15.95±1.37 ^{ab}	15.17±1.05 ^a	12.89±0.91 ^a	1.98±0.66
10.3 Kpb	1440	20.18±2.70 ^b	22.67±2.5 ^b	19.23±2.68 ^b	0.96±0.25

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Anova Tabla 39

Fuente de Variación	% Spz muertos	% Unión	% Unión spz muertos	% Unión spz vivos
Tipo ADN	0.90	0.16	0.94	0.52
Tiempo incubación	<0.01	<0.01	<0.01	0.44
Interacción tipo ADN y tiempo	0.90	0.95	0.93	0.52

FIGURA 55. Comparación gráfica de la cinética de unión de los espermatozoides a dos tamaños diferentes de ADN exógeno (5.7 Kpb y 10.3 Kpb) medidos a lo largo del tiempo.



4.1.6 Localización de la interacción entre el transgén y el espermatozoide

Los espermatozoides frescos (intactos) se unen en menor proporción al ADN que los espermatozoides sometidos a un proceso de congelación y descongelación y a su vez menos que los espermatozoides con alteraciones de sus membranas por congelación rápida (Tabla 40).

El empleo de las técnicas de inmunocitología haciendo uso de marcadores con fluoresceína (FITC) y con peroxidasa (HRP) son igualmente válidas para

valorar el grado de unión de los espermatozoides al ADN. No obstante, se detecta una tendencia ($p=0.08$) a obtener mayores valores en los porcentajes de unión cuando se usa fluoresceína y se detectan diferencias en estas técnicas en cuanto a la eficacia de localizar la unión del ADN en las diferentes partes de la cabeza espermática.

Cuando se usa fluoresceína (FITC) como marcador, se le asigna un mayor porcentaje de células con unión al ADN por la totalidad de la cabeza espermática y a la región acrosomal que cuando se usa peroxidasa (HRP). Mientras que ocurre lo contrario para HRP, que detecta porcentaje mayores de unión a la región postacrosomal que cuando se usa FITC (Tabla 40).

TABLA 40. Localización del ADN exógeno en espermatozoides sometidos a diferentes grados de permeabilización de sus membranas (intactos, congelados-descongelados, congelación rápida). Evaluación mediante dos técnicas de tinción (FITC y HRP).

Tratamiento espermático	Tinción	Acrosoma	Post-acrosomal	Ambas	No teñido
Espermatozoides intactos	FITC	32.00±5.47	5.23±1.78	26.23±5.21	36.54±5.90
Espermatozoides intactos	HRP	5.38±1.29	30.62±3.84	15.08±4.04	48.92±6.79
Congelación-descongelación	FITC	12.21±2.97	20.93±3.44	40.86±2.88	26.00±3.05
Congelación-descongelación	HRP	4.93±1.22	43.87±2.64	22.67±3.15	28.67±4.46
Congelación rápida	FITC	6.71±1.27	12.64±1.62	68.93±2.36	11.64±2.40
Congelación rápida	HRP	2.33±0.71	35.33±6.05	44.67±7.67	17.67±5.74

Anova Tabla 40

Fuente de Variación	Acrosoma	Region postacrosomal	Ambas	No teñido
Tratamiento espermático	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Tinción	<0.01	<0.01	<0.01	0.08
Interacción	<0.01	0.91	0.34	0.60

Al detectar que la tinción afecta a los resultados de la observación, hemos analizado por separado cada una de ellas, expresando en las siguientes *tablas* (41 y 42) el porcentaje de unión al ADN en su totalidad, seguido de la manera proporcional en la que se produce la unión en cada una de las zonas. De este modo el porcentaje de unión a los acrosomas, sumado a la unión en la región postacrosomal y al de unión a toda la cabeza espermática suma el 100%.

Con la **tinción FITC** se observó que el semen fresco presenta el menor porcentaje de unión al ADN, y las células se unen el plásmido mayoritariamente en la región acrosomal. Cuando los espermatozoides son sometidos a un proceso de congelación (congelación-descongelación y congelación rápida), y sus membranas se alteran, aumenta la proporción de espermatozoides unidos, pero además varía el patrón de unión, ya que tiende a unirse en toda la cabeza espermática (*Tabla 41*).

TABLA 41. Localización del ADN exógeno, mediante FITC, en espermatozoides sometidos a diferentes grados de permeabilización de sus membranas (intactos, congelación-descongelación, congelación rápida).

Tratamiento espermático	% Unión	Acrosoma	Post-acrosomal	Ambas
Espermatozoides intactos	63.46±5.90 ^a	51.09±7.70 ^a	8.87±3.50 ^a	40.04±5.88 ^a
Congelación-descongelación	74.00±3.05 ^{ab}	17.77±4.49 ^b	27.41±4.38 ^b	54.82±2.55 ^b
Congelación rápida	88.29±2.38 ^b	7.76±1.58 ^b	14.15±1.68 ^a	78.09±1.75 ^c
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

^{a, b, c} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Con la **tinción HRP** llegamos a las mismas conclusiones en cuanto al porcentaje de células que se unen al ADN, que crece significativamente con el tratamiento de congelación. Sin embargo, el patrón de unión es diferente. Predomina la unión en la región postacrosomal, que se mantiene en valores similares para los tres grupos experimentales ($p=0.06$). No obstante, en los espermatozoides sometidos a un proceso de congelación rápida hay un mayor

porcentaje de unión en los acrosomas (acrosomas + ambas) que en los otros dos grupos restantes (Tabla 42).

Observamos que en la mayoría de los espermatozoides que tenían los acrosomas dañados (sobre todo por procesos de congelación), la tinción (HRP o FITC) se encontraba localizada concretamente en el contenido acrosomal.

TABLA 42. Localización del ADN exógeno, mediante HRP, en espermatozoides sometidos a diferentes grados de permeabilización de sus membranas (intactos, congelación-descongelación, congelación rápida).

Tratamiento espermático	% Unión	Acrosoma	Post-acrosomal	Ambas
Espermatozoides intactos	51.08±6.79 ^a	11.03±3.06 ^a	61.93±5.23	27.03±5.31 ^a
Congelación-descongelación	71.47±4.44 ^b	6.85±1.73 ^{ab}	63.04±3.72	30.10±3.17 ^a
Congelación rápida	82.33±5.74 ^b	2.94±0.87 ^b	45.16±7.71	51.89±7.24 ^b
P	<0.01	0.04	0.06	<0.01

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

El **microscopio electrónico** reveló numerosos gránulos de oro en los espermatozoides que corresponden a ADN unido. Estas moléculas fueron particularmente observadas en el acrosoma, región postacrosomal y también asociadas a la membrana plasmática y matriz acrosomal. Igualmente se observaron gránulos asociados a la región correspondiente al núcleo espermático, esta región nuclear se relaciona con el segmento ecuatorial de la cabeza espermática. Otras estructuras como la cola y pieza intermedia presentaban escasos gránulos de oro. Las imágenes obtenidas quedan reflejadas en la *figura 36*. Según los tratamientos utilizados:

- Los *espermatozoides intactos* mostraron una mayor integridad de la estructura acrosomal que aquellos espermatozoides sometidos a procesos de congelación. Con respecto a la interacción con el transgén, presentaron una mayor cantidad de gránulos de oro localizados en la región acrosomal

que en otras zonas de la cabeza espermática. Corroborando, de este modo, lo observado en los ensayos microscopia de fluorescencia con FITC.

- En el caso de los espermatozoides congelados (*congelación-descongelación y congelación rápida*) los acrosomas presentaron una alteración de sus membranas más acentuada en el caso de espermatozoides sometidos a un proceso de congelación rápida. Igualmente se detectaron partes de la membrana plasmática permeabilizadas y gravemente alteradas. En cuanto a la unión con el ADN, cuando observamos un daño acrosomal acentuado, detectamos que la unión tiene lugar, principalmente, en el contenido acrosomal.

4.2 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS

4.2.1 Evaluación de la técnica de transgénesis espermática mediante ICSI sobre el desarrollo de embriones transgénicos

4.2.1.1 Eficiencia de la técnica de transgénesis espermática mediante ICSI utilizando espermatozoides intactos

En este primer estudio de ICSI se inyectaron un total de 167 ovocitos madurados *in vitro*. La división embrionaria para el grupo experimental fue de un 44% (64/144), y 16 de ellos llegaron a estadio de blastocisto (25%) con un número medio de células por blastocisto de 22.71 ± 3.64 . De los embriones obtenidos, 14 (21.8%) de ellos expresaban la proteína verde fluorescente. Estos embriones, que expresaban la proteína, se encontraban en diferentes estadios, desde embriones de 2 células hasta blastocisto. Algunos de los embriones transgénicos obtenidos mediante ICSI, observamos que eran mosaicos, es decir no todas las blastómeras del embrión expresaban el gen EGFP.

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 ($p > 0.05$) y con un número medio de células por blastocisto idéntico. Los datos de esta experiencia quedan reflejados en la *tabla 43*.

TABLA 43. Parámetros del desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos inyectados con espermatozoides intactos sin ADN (-ADN=control) e incubados con ADN (+ADN). Evaluación de la expresión del gen EGFP en grupo intactos (+ADN).

Tratamiento espermático	Nº ovocitos	División (%)	Blastocistos* (%)	Nº células/ blastocisto	% Expresión EGFP*
Intactos (-ADN)	23	60±10.00	20.00±10.69	22.00±3.00	-
Intactos (+ADN)	144	44.44±4.16	25.00±5.46	22.71±3.64	21.87±5.21
P		0.15	0.69	0.93	

*En relación a los embriones divididos

4.2.1.2 Efecto de la permeabilización de las membranas espermáticas por métodos físicos: Congelación-descongelación y congelación rápida, sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

La utilización de espermatozoides congelados permitió la obtención de un número similar de embriones al del grupo control utilizando semen fresco. Las tasas de embriones transgénicos, que expresaban la proteína verde fluorescente, conseguidas en esta experiencia se cifraron alrededor del 40%, sin encontrar diferencias entre los grupos experimentales.

En la *tabla 44* observamos los resultados obtenidos para esta experiencia (espermatozoides intactos vs. congelación-descongelación), donde destacamos que no se encontraron diferencias significativas para las variables estudiadas entre ambos grupos, división embrionaria, porcentaje de blastocistos, número de células por blastocisto y porcentaje de embriones transgénicos.

TABLA 44. Parámetros del desarrollo embrionario *in vitro* y expresión de la proteína EGFP, de los ovocitos inyectados con espermatozoides intactos y congelados-descongelados, incubados ambos con ADN exógeno.

Tratamiento espermático	Nº ovocitos	División (%)	Blastocistos* (%)	Nº células/ blastocisto	% Expresión EGFP*
Intactos	168	50.60±3.87	12.94±3.66	51.10±12.51	37.65±5.29
Congelación-descongelación	180	49.44±3.74	11.24±3.37	42.80±9.15	44.94±5.30
P		0.83	0.73	0.60	0.330

*En relación a los embriones divididos

Por otro lado, la utilización de espermatozoides sometidos a un proceso de congelación y descongelación rápida, que lleva asociada una alteración intensa de la membrana espermática, resultó en un aumento del porcentaje de embriones transgénicos (84.09 vs. 53.06%, $p < 0.01$). La producción embrionaria con estos espermatozoides presentó porcentajes de división embrionaria y de producción de blastocistos con tendencia a ser inferiores que en el grupo control, sin que esas diferencias alcanzaran niveles significativos (Tabla 45).

TABLA 45. Parámetros del desarrollo embrionario *in vitro* y expresión de la proteína EGFP, de los ovocitos inyectados con espermatozoides intactos y sometidos a una congelación rápida, ambos grupos incubados con ADN.

Tratamiento espermático	Nº ovocitos	División (%)	Blastocistos* (%)	Nº células/ blastocisto	% Expresión EGFP*
Intactos	105	46.67±4.89	14.29±5.05	36.40±7.08	53.06±7.20 ^a
Congelación rápida	101	38.61±7.87	2.56±2.56	25.00±1.00	84.09±5.58 ^b
P		0.24	0.06	0.38	<0.01

*En relación a los embriones divididos

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.2.1.3 Efecto de la permeabilización de membranas por métodos químicos (Tritón X-100) sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

La utilización en el sistema ICSI-SMGT de espermatozoides sometidos a un tratamiento con Tritón X-100, dio lugar a una menor tasa de división embrionaria y niveles similares en la tasa de formación de blastocistos y embriones transgénicos que el grupo control (intactos) (Tabla 46).

TABLA 46. Parámetros de desarrollo embrionario *in vitro* y expresión de la proteína EGFP, de los ovocitos inyectados con espermatozoides intactos y tratados con Tritón X-100, ambos grupos incubados con ADN.

Tratamiento espermático	Nº ovocitos	División (%)	Blastocistos* (%)	Nº células/ blastocisto	% Expresión EGFP*
Intactos	101	53.47±4.99 ^a	3.70±2.59	41.33±12.89	20.37±5.53
Tritón X-100	96	32.29±4.80 ^b	0	-	29.03±8.29
P		0.01	0.28		0.37

*En relación a los embriones divididos

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.2.1.4 Efecto del uso de la recombinasa RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

Como muestra la tabla 47 no se encontraron diferencias significativas ni en la producción ni en la calidad de los embriones producidos en los dos grupos experimentales (variables de división, % de blastocistos y número de células por blastocisto). En relación a la expresión de la proteína, es de reseñar el alto porcentaje de embriones transgénicos obtenidos para el grupo RecA, llegando a valores próximos al 90% de expresión, muy superior al 51.56% de embriones transgénicos del grupo control. Debemos además destacar que en 7 de los 9 replicados en los que se utilizó RecA, el total de los embriones analizados expresaban la proteína.

TABLA 47. Parámetros de desarrollo embrionario *in vitro* y expresión de la proteína EGFP, de los ovocitos inyectados con espermatozoides intactos y tratados con RecA, ambos grupos incubados con ADN.

Tratamiento espermático	Nº ovocitos	División (%)	Blastocistos* (%)	Nº células/ blastocisto	% Expresión EGFP*
Intactos	117	54.70±4.62	10.94±3.93	43.33±9.92	51.56±6.30 ^a
RecA	131	50.38±4.39	18.18±4.78	37.58±5.75	87.88±4.05 ^b
P		0.50	0.25	0.60	<0.01

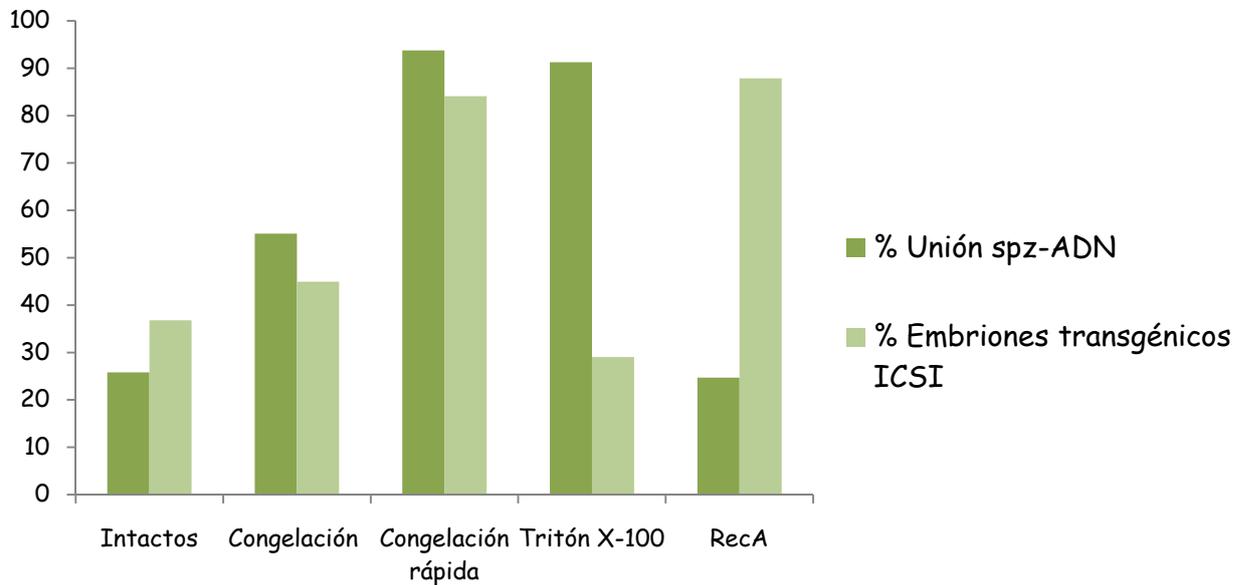
*En relación a los embriones divididos

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

A modo de resumen, en la siguiente gráfica (*Figura 56*) se muestran los resultados de unión entre el ADN y los espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos en las experiencias previamente descritas, junto con el porcentaje de embriones transgénicos producidos por ICSI utilizando estos espermatozoides.

Al analizar los resultados de los tres primeros grupos experimentales (intactos, congelación y congelación rápida) observamos que existe una correlación directa entre la unión al ADN y el porcentaje de embriones transgénicos producidos, mientras que para el grupo de Tritón X-100 y RecA no existe tal relación. En el grupo de Tritón X-100 existe un porcentaje de unión al ADN cercano al 90%. Sin embargo, en este grupo la producción de embriones transgénicos no supera el 30%. Por el contrario, en el grupo RecA observamos justamente la relación inversa, es decir cuando medimos la unión del ADN a los espermatozoides mediante citometría de flujo se encuentra en un 30% mientras que los embriones transgénicos logrados por esta técnica rondan el 90%.

FIGURA 56. Gráfica comparativa entre la unión del espermatozoide con el transgén y el porcentaje de producción de embriones transgénicos por ICSI.



4.2.2 Evaluación de la técnica de transgénesis espermática mediante FIV utilizando semen intacto. Efecto del uso de la proteína RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por FIV

La utilización de la fecundación *in vitro* (FIV) con espermatozoides incubados en presencia del ADN exógeno no permitió la obtención de embriones que expresaran la proteína EGFP.

La coincubación de los espermatozoides con ADN indujo una menor tasa de división embrionaria que cuando se utilizó conjuntamente ADN con RecA (41.26 ± 4.13 vs. 25.13 ± 2.22 , $p < 0.05$). Mientras que las tasas de división para el grupo control, en el que no se utilizó ADN, se mantuvieron en una posición intermedia (38.98 ± 6.40 , *Tabla 48*). Por otra parte, la producción de blastocistos fue similar en los 3 grupos estudiados (21.74 ± 8.79 vs. 21.87 ± 4.24 vs. 15.25 ± 4.72), así como la calidad de los embriones obtenidos, valorada por el número medio de células por blastocisto (*Tabla 48*).

TABLA 48. Media y SEM para los parámetros del desarrollo embrionario *in vitro* y expresión del gen EGFP, producidos mediante FIV con espermatozoides intactos incubados con (+ADN) y sin ADN (-ADN) e intactos incubados con los complejos RecA:ADN.

Tratamiento espermático	Nº ovocitos	División (%)	Blastocistos* (%)	Nº células /blastocisto	% Expresión EGFP*
Intactos (-ADN)	59	38.98±6.40 ^{ab}	21.74±8.79	36.40±9.28	-
Intactos (+ADN)	382	25.13±2.22 ^a	21.87±4.24	37.26±3.32	0
Intactos (+RecA:ADN)	143	41.26±4.13 ^b	15.25±4.72	28.45±3.34	0
P		<0.01	0.59	0.27	

*En relación a la división embrionaria

^{a, b} en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.3 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES Y LECHONES TRANSGÉNICOS

4.3.1 Obtención de lechones transgénicos por inseminación intrauterina profunda

Tres de las cuatro cerdas inseminadas fueron diagnosticadas gestantes por evaluación ultrasonográfica a los 25-28 días post-inseminación (tasa de fecundación del 75%). Transcurrido el período de gestación (113-117 días de gestación) las cerdas terminaron en partos normales que dieron lugar a un total de 22 lechones (9 hembras y 13 machos).

La cerda nº 2 parió a 8 lechones, 4 de los cuales nacieron muertos y uno murió pocas horas tras el nacimiento. A los lechones nacidos muertos les fue realizada una necropsia para conocer la causa de la muerte, diagnosticándose finalmente muerte perinatal por asfixia.

Todos los lechones evaluados mostraron unas condiciones fisiológicas y morfológicas normales, con un peso medio de la camada de la cerda nº 2 de 1143 ± 112 gr y 1905 ± 68 gr para los lechones obtenidos de la cerda nº 3. Las pruebas realizadas tanto para conocer la integración del transgén (PCR) como la expresión de la proteína EGFP para cada uno de los lechones nacidos, tanto vivos como muertos, nos proporcionaron unos resultados negativos. Los resultados quedan reflejados en la *tabla 49*.

TABLA 49. Resultados de fecundación de las cerdas mediante inseminación intrauterina profunda con semen incubado con ADN (EGFP).

	Gestación	Días gestación	Nº lechones	Hembras + Machos	Integración EGFP	Expresión EGFP
Cerda 1	+	116	4	2 + 2	0	0
Cerda 2	+	113	8	4 + 4	0	0
Cerda 3	+	117	10	3 + 7	0	0
Cerda 4	-	Retorno al celo > 21 días	-	-	-	-

4.3.2 Obtención de embriones transgénicos por inseminación intrauterina quirúrgica

La inducción de la ovulación dio como resultado el desarrollo de 10.50 ± 2.90 cuerpos lúteos de media por cerda. Tras la intervención quirúrgica, se recogieron un total de 5 embriones, siendo todos los embriones en estadio de blastocisto y con una alta calidad (dos de ellos tenían más de 400 células) (*Tabla 50*). Cuando analizamos mediante el microscopio de fluorescencia los blastocistos recogidos a los 6-7 días tras la inseminación, ninguno de ellos expresó la proteína EGFP.

TABLA 50. Resultados de fecundación por inseminación intrauterina quirúrgica con semen incubado con ADN (EGFP). Resultados de la recogida de los embriones a los 6-7 días tras la inseminación.

	Cuerpos lúteos (por ovario)	Nº embriones recolectados	Ratio recogida embriones (%)	Nº blastocistos (%)	Nº células/ blastocisto	Expresión EGFP (%)
Cerda 5	8(5/3)	0	0(0)	-	-	-
Cerda 6	6(6/0)	3	3/6(50)	3(50)	34.67±2.85	0(0)
Cerda 7	9(7/2)	2	2/9(22.2)	2(22.2)	>400	0(0)
Cerda 8	19(11/8)	0	0(0)	-	-	-
Valores medios	(42/4) 10.50±2.90	(5/4) 1.25±0.75	(5/42) 11.90%	(5/5) 100%	(5/5) 180.80±89.50	

4.3.3 Obtención de lechones transgénicos por transferencia quirúrgica de embriones

Los resultados de la transferencia de embriones producidos por ICSI-SMGT-RecA se hallan reflejados en las *tablas 51 y 52*. Se inyectaron un total de 412 ovocitos, que fueron transferidos quirúrgicamente en el oviducto de 4 cerdas prepúberes superovuladas (95-113 ovocitos por receptora). Tres de las hembras transferidas retornaron al celo pasados 21 días o más de la transferencia. La hembra nº 12, a la que se transfirieron un mayor número de cigotos (113), fue diagnosticada gestante a los 25 días tras la transferencia embrionaria, lo que supone una tasa de éxito del 25%. Se siguió la evolución de la gestación mediante observación ecográfica hasta el día 75. A los 113 días de gestación parió 8 lechones (5 hembras y 3 machos). De ellos, tres nacieron muertos. Los lechones nacidos vivos no manifestaron alteraciones anatómicas ni fisiológicas y tuvieron un crecimiento normal. El peso medio de la camada fue de 1035±334 gr. El crecimiento de los lechones en las primeras semanas de vida fue normal para este tipo de animales y condiciones de explotación (*Tabla 53*).

TABLA 51. Resultados de las transferencias de ovocitos fecundados mediante ICSI con los complejos RecA: ADN: espermatozoides.

	Nº cigotos transferidos	Gestación	Nº lechones obtenidos
Cerda 9	102	Retorno al celo > 21 días	-
Cerda 10	102	Retorno al celo > 21 días	-
Cerda 11	95	Retorno al celo > 21 días	-
Cerda 12	113	+	8
Total	103±3.72	25%	8

TABLA 52. Resultados de los lechones obtenidos mediante la transferencia de embriones.

	Estado	Peso (gr)	Sexo
Lechón 034	Vivo	1.500	Hembra
Lechón 035	Vivo	1.020	Hembra
Lechón 036	Vivo	1.300	Hembra
Lechón 037	Vivo	800	Macho
Lechón 038	Vivo	1.100	Hembra
Lechón 039	Muerto	1.200	Macho
Lechón 040	Muerto días	960	Macho
Lechón 041	Momificado	400	Hembra
Total		1.035±334	

TABLA 53. Resultados del crecimiento de los lechones nacidos por transferencia de embriones ICSI.

Peso	Al nacer (gr)	1 semana (gr)	4 semanas (kg)
Lechón 034	1.500	2.950	>15
Lechón 035	1.020	2.650	9.75
Lechón 036	1.300	2.800	11
Lechón 037	800	1.750	7.5
Lechón 038	1.100	2.650	11
Total	1.144±267	2.560±469	

Los datos obtenidos tras practicar la necropsia de los tres lechones nacidos muertos fueron los siguientes:

- **Nº 039:** Atelectasia pulmonar, el animal muere antes de llegar a respirar. No se observan signos patológicos de mención.
- **Nº 040:** Varios días muerto en el interior del útero (2-3 días), presenta signos de descomposición cadavérica.
- **Nº 041:** Momificado (muerte aproximada en el día 70 de gestación).

Por último, se realizaron análisis mediante PCR para detectar la presencia de ADN de virus [Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (SRRP) y circovirus porcino PCV] y bacterias (Salmonella) en las muestras de los lechones nacidos muertos, para descartar la posible causa de la muerte por infección viral o bacteriana. Los resultados que obtuvimos fueron negativos excepto por la presencia de ADN de circovirus en muestras de los lechones nº 039 y 040, pero analizando las condiciones epidemiológicas del caso no parece ser esta infección la posible causante de la muerte.

4.3.3.1 Análisis de la integración del transgén

De todos los *animales* analizamos la **integración** del transgén mediante PCR en diferentes tejidos.

De los animales nacidos muertos fue posible analizar 12 tejidos diferentes. Resultó que 2 de los 3 animales nacidos muertos fueron positivos en esta prueba. Los lechones (n° 039 y 040) integraron el transgén en el 75% (9/12) de los tejidos analizados. Los resultados se muestran a continuación en la *tabla 54* y en las *figuras 57* y *58*. En ambos animales la muestra cardiaca fue negativa, mientras que fue positiva en ambos para hígado, riñón, cerebro, músculo, gónadas, estómago e intestino. Mostrándose positivo para un único animal la piel, pulmón, bazo y el paquete vascular pericárdico.

TABLA 54. Análisis de la integración de EGFP mediante PCR de diferentes tejidos procedentes de los lechones nacidos muertos. La clasificación llevada a cabo fue la siguiente: (-) no hay señal, (+++) señal elevada, (++) señal media, (+) señal.

	Tejidos analizados	Lechón 039	Lechón 040	Lechón 041
1	Hígado (HI)	+	+	-
2	Riñón (RI)	++	+++	-
3	Cerebro (CE)	+	+	-
4	Piel (PI)	-	+	-
5	Músculo (MU)	+	+	-
6	Pulmón (PU)	+	-	-
7	Corazón (CO)	-	-	-
8	Testículo (TE)/ovario(OV)	+	+	-
9	Bazo (BA)	+	-	-
10	Estómago (ES)	++	+	-
11	Intestino (IN)	++	+	-
12	Paquete Vascular (PV)	-	+	-

FIGURA 57. Análisis por PCR del ADN genómico del lechón nº 039 en diferentes tejidos. Los tejidos positivos para la integración de EGFP se muestran en color verde.

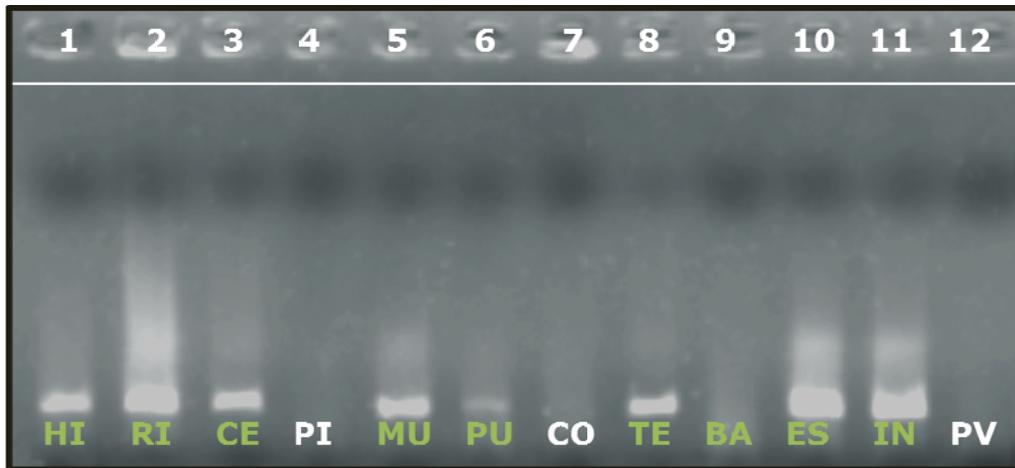
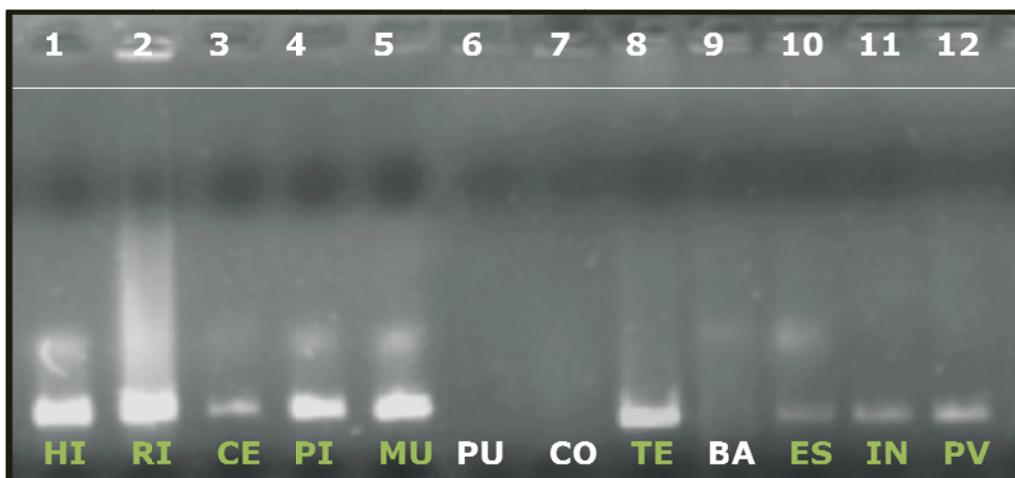


FIGURA 58. Análisis por PCR del ADN genómico del lechón nº 040 en diferentes tejidos. Los tejidos positivos para la integración de EGFP se muestran en color verde.



En los *cinco lechones nacidos vivos* se analizó la integración del transgén en ocho muestras de los tejidos que se detallan en la *tabla 55*. Los resultados obtenidos hasta el momento, en los tejidos analizados, se muestran negativos.

TABLA 55. Resultados de los análisis de integración de EGFP mediante PCR de diferentes tejidos procedentes de los lechones nacidos vivos

	Tejidos analizados	Lechón 034	Lechón 035	Lechón 036	Lechón 037	Lechón 038
1	Piel	-	-	-	-	-
2	Cartílago	-	-	-	-	-
3	Sangre	-	-	-	-	-
4	Músculo	-	-	-	-	-
5	Mucosa intestinal	-	-	-	-	-
6	Mucosa oral	-	-	-	-	-
7	Mucosa nasal	-	-	-	-	-
8	Hígado	-	-	-	-	-

4.3.3.2 Análisis de la expresión de la proteína EGFP

(1) Visualización directa

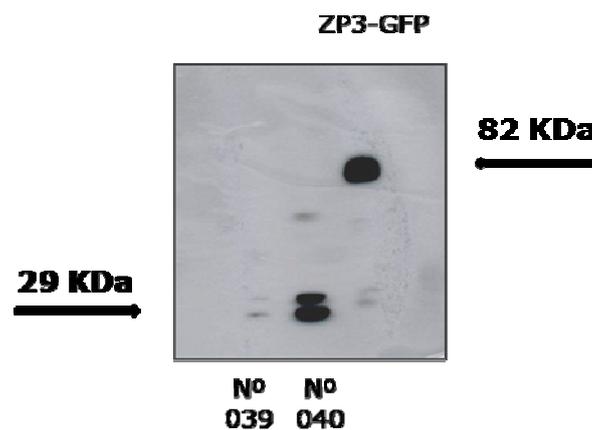
Realizamos un análisis de la expresión de la proteína EGFP mediante observación directa de los animales tras la iluminación con una lámpara de UV. En ninguno de los 8 lechones analizados se detectó señal verde fluorescente.

(2) *Western Blot*

En muestras procedentes de los dos animales positivos en la prueba de PCR (nº 039 y 040), y que por tanto habían integrado el transgén, se procedió a detectar la expresión de la proteína EGFP en los diferentes tejidos mediante la técnica de *Western Blot* (Ver tabla 56). Previamente se realizó una determinación de la cantidad de proteína total (mediante BCA) que había en cada uno de los tejidos analizados. Finalmente, utilizamos una concentración de 100 µg de proteína de cada tejido en los análisis llevados a cabo.

El control positivo, para cada uno de los análisis, se realizó usando ZP3-GFP con un peso molecular de 82.2 KDa, mientras que la EGFP, objeto de análisis, tiene un peso de 29 KDa (*Ver figura 59*).

FIGURA 59. Imagen obtenida mediante análisis por *Western Blot* de la expresión de la proteína EGFP del hígado de los lechones n° 039 y n° 040, comparado con el control positivo ZP3-GFP de un peso de 82.2 KDa, frente a los 29 KDa de la EGFP.



Los resultados obtenidos muestran valores positivos en los diferentes tejidos analizados de ambos animales correspondientes al peso molecular de la EGFP (29 KDa).

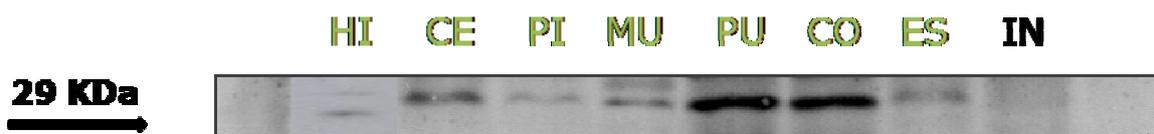
Además en el revelado de la membrana de nitrocelulosa se detectaron diversas bandas inespecíficas, en algunos tejidos, de un peso molecular mayor que la EGFP.

Para los tejidos analizados del **lechón n° 039** (*Tabla 56*) observamos que todos ellos presentaron expresión, aunque en diferentes grados, excepto el intestino donde no se obtuvo ninguna señal (*Figura 60*). En relación a las muestras de piel y corazón detectamos la expresión de la proteína, aun cuando en el análisis por PCR no se había detectado la integración del transgén. Los niveles de expresión de la EGFP detectados fueron mayores en las muestras procedentes del pulmón y corazón seguidos por las muestras de cerebro y músculo.

TABLA 56. Resultados de los análisis de expresión de EGFP mediante *Western Blot* de diferentes tejidos procedentes de los lechones transgénicos nacidos muertos n° 039 y n° 040. (ND) no determinado, (-) no hay señal, (+++) señal elevada, (++) señal media, (+) señal.

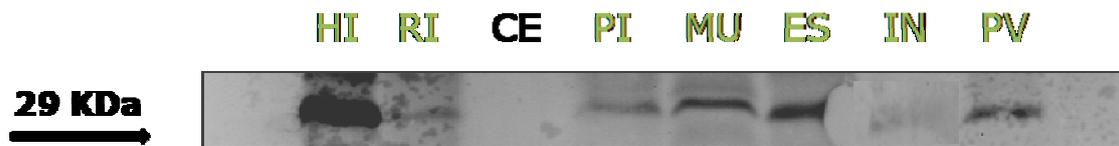
	Tejidos analizados	Lechón 039	Lechón 040
1	Hígado (HI)	+	+++
2	Riñón (RI)	ND	++
3	Cerebro (CE)	++	-
4	Piel (PI)	+	++
5	Músculo (MU)	++	++
6	Pulmón (PU)	+++	ND
7	Corazón (CO)	+++	ND
8	Testículo (TE)	ND	ND
9	Bazo (BA)	ND	ND
10	Estómago (ES)	+	+++
11	Intestino (IN)	-	+
12	Paquete Vascular (PV)	ND	++

FIGURA 60. Imagen obtenida mediante análisis por *Western Blot* de la expresión de la proteína EGFP en diferentes tejidos procedentes del lechón n° 039. Los tejidos positivos para la expresión de EGFP se muestran en color verde.



En el **lechón nº 040**, en todos los tejidos analizados mediante *Western Blot* se detectó la expresión de la proteína verde fluorescente (*Tabla 56*) (*Figura 61*), excepto en el cerebro donde se detectó integración pero no expresión. Los mayores niveles de expresión fueron detectados en hígado y estomago.

FIGURA 61. Imagen obtenida mediante análisis por *Western Blot* de la expresión de la proteína EGFP en diferentes tejidos procedentes del lechón nº 040. Los tejidos positivos para la expresión de EGFP se muestran en color verde.



Para el caso de los tejidos de intestino (lechón nº 039) y cerebro (lechón nº 040), que mostraron niveles negativos de expresión en el análisis anteriormente realizado con una cantidad de proteína por muestra de 100 µg, se aumentó dicha cantidad en las muestras procesadas (entre 115 y 185 µg). Pero en este segundo análisis de *Western Blot* los resultados continuaron siendo negativos.

DISCUSIÓN

La producción de organismos transgénicos ha sido el mayor avance en el ámbito de la biología en los últimos tiempos, siendo providencial en el estudio de mecanismos genéticos de regulación y desarrollo biológico. Se han producido numerosas mejoras en la tecnología de la transgénesis desde su inicio allá por el año 1981 (Gordon & Ruddle 1981), y son varios los sistemas de transferencia de ADN que se realizan hoy en día con una gran eficiencia y con unos costes reducidos. Desde hace casi dos décadas, la técnica de SMGT ha centrado la atención de numerosos investigadores en un continuo debate sobre la transgénesis animal. En 1989 se publicó un trabajo donde se demostraba la capacidad que tenían los espermatozoides de transportar ADN exógeno y transferir estas moléculas mediante fecundación dando lugar a animales modificados genéticamente (Lavitrano *et al.* 1989). Esto supuso un importante avance en el campo de la transgénesis, de manera que la SMGT podría ser considerada por su relativa sencillez y bajo coste, como la técnica de elección para la producción de animales de granja modificados genéticamente y representaría una poderosa herramienta para la investigación en diversos campos de la medicina. Usando esta técnica se han obtenido un porcentaje que se encuentra entre el 5 y el 80 de animales transgénicos del total de nacidos y la eficiencia varía según las especies de aplicación. Esta técnica, por tanto, mejora notablemente la eficiencia que se alcanza cuando se emplea la microinyección pronuclear que se encuentra entre 0.5-4% (Niemann & Kues 2003).

El **objetivo principal** de esta Tesis fue contribuir en el desarrollo de un método eficiente de producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos y lechones *in vivo* aprovechando la capacidad de transferencia de ADN exógeno

que presenta el espermatozoide. Para intentar cumplir el objetivo principal, dividimos nuestro estudio en 3 bloques de experiencias: (1) Estudio de la capacidad de transferencia de ADN exógeno en los espermatozoides porcinos; (2) Producción *in vitro* de embriones transgénicos; (3) Producción *in vivo* de embriones y lechones transgénicos.

5.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE ADN EXÓGENO A LOS ESPERMATOZOIDES PORCINOS

Desde que se redescubrió la SMGT hasta nuestros días se han publicado numerosos trabajos en relación a esta técnica de transgénesis, que demuestran el éxito en numerosas especies (Spadafora 1998; Smith & Spadafora 2005). Se han observado variaciones en las especies de granja tanto en la eficiencia del transporte de ADN que presentan los espermatozoides como en la eficiencia en la generación de animales transgénicos (Smith & Spadafora 2005). Una alta eficiencia en la producción de animales se ha logrado en cerdos (más del 80% de la descendencia; Lavitrano *et al.* 2002), mientras que el éxito fue más limitado en la producción de cabras transgénicas (Schellander *et al.* 1995). Las causas de las diferencias entre laboratorios y entre especies no han sido todavía aclaradas.

Un factor determinante es el proceso de unión que se debe producir entre el espermatozoide y el ADN. Además de las diferencias en el grado de unión detectado entre especies (Spadafora 1998), se han encontrado diferencias con respecto al porcentaje de unión dentro de la misma especie. Así, Castro *et al.* (1991) encuentran que solo el 0.3% de los espermatozoides de cerdo unen el ADN, mientras Camaioni *et al.* (1992) publican un 78% de unión. Además, en relación a la localización del transgén, también existen controversias, la mayoría de los autores describen que la unión se produce en la región postacrosomal y en el núcleo (Lavitrano *et al.* 1991, 1992) pero otros autores también encuentran evidencias del transgén en la zona acrosomal, matriz acrosomal, cola... (Atkinson *et al.* 1991; Huguet & Esponda 1998).

Nuestra hipótesis de partida fue que profundizando en el conocimiento del proceso de **unión entre ADN exógeno y los espermatozoides**, así como el desarrollo en la aplicación de las técnicas para su adecuada visualización y evaluación, podría mejorar el rendimiento de la técnica SMGT en la especie porcina.

Como punto de partida debíamos conocer la capacidad de transferir ADN de los espermatozoides porcinos en nuestras condiciones de trabajo. Para ello, la primera experiencia se basó en discernir como afectaba la presencia de plasma seminal sobre la unión entre el transgén y las células espermáticas. A continuación, nos propusimos estudiar la cinética de unión que llevaban a cabo los espermatozoides y el material genético a lo largo del tiempo, y la influencia del medio de cultivo donde se incuban los espermatozoides y el transgén sobre la unión. El siguiente paso a seguir fue constatar si los espermatozoides con las membranas alteradas eran capaces de unir el transgén. Por último, en relación con el estudio espermático, nos planteamos dilucidar en qué lugar específico se produce la unión.

5.1.1 Efecto de la presencia o ausencia del plasma seminal en la unión espermatozoide-ADN exógeno

5.1.1.1 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno mediante el uso de espermatozoides eyaculados

Si las células espermáticas pueden actuar como vectores de secuencias génicas exógenas, significa que el genoma de animales reproducidos sexualmente puede estar expuesto a la influencia de los genes foráneos que pueden transportarse unidos a los espermatozoides, con importantes implicaciones en los procesos evolutivos. De aquí procede el escepticismo del método SMGT debido al caos evolutivo que supondría que las células espermáticas fueran capaces de actuar como vectores de ADN exógeno. Dado que en los tractos reproductivos se pueden encontrar ADN procedente de diversas células (bacterias, etc.), material subcelular y virus que pueden contener moléculas de ADN libre (originarias de la muerte celular natural), es por tanto razonable pensar que las células espermáticas son altamente resistentes a la hora de capturar dichas moléculas. Debido a las numerosas publicaciones relacionadas con la SMGT y el hecho de que ningún caos evolutivo al respecto se ha producido, cabe pensar que la naturaleza posee formidables barreras que eviten que el espermatozoide sea capaz de transferir ADN exógeno al nuevo embrión, aunque estas barreras no son absolutas ni infranqueables, debido a los resultados obtenidos con esta técnica. Entre las barreras que antagonizan la captación y el transporte del ADN exógeno podrían encontrarse la actividad enzimática en los espermatozoides, además de que el plasma seminal (PS) o componentes presentes en el mismo inhiban el proceso de unión. Los

espermatozoides están sujetos a la interacción con las proteínas procedentes del epidídimo y del PS. Estas proteínas tienen como función estabilizar las membranas espermáticas frente a prematura capacitación y una reacción acrosómica espontánea (Vadnais & Roberts 2006). Por lo tanto, el plasma seminal podría jugar un papel importante actuando como una barrera natural y protegiendo a los espermatozoides de intrusiones de moléculas exógenas que pudieran comprometer la integridad del espermatozoide y la identidad genética de la progenie. Indudablemente la membrana plasmática de los espermatozoides es uno de los obstáculos que previene la incorporación de ADN exógeno.

Debido al efecto inhibitorio que presentan algunos componentes del plasma seminal quisimos comprobar cómo afectaba la presencia de diferentes cantidades del mismo (0%, 10%, 50% de plasma seminal) sobre la unión entre los espermatozoides y el ADN foráneo, y en qué medida difiere la unión entre diferentes machos utilizados. Además, debido al efecto tóxico que puede presentar el ADN sobre los espermatozoides cuando se encuentra en grandes cantidades (Maione *et al.* 1997; Sciamanna *et al.* 2000), comprobamos si con las concentraciones de uso de nuestro gen, el simple hecho de su presencia, afectaba la calidad seminal.

En nuestros resultados observamos que el tratamiento de eliminación total del plasma seminal era el más efectivo para facilitar la unión del ADN a los espermatozoides, y que el **porcentaje de plasma seminal** presente durante la incubación, era inversamente proporcional a la unión que se establece entre el espermatozoide y transgén. Estos resultados son coincidentes por los mostrados por Lavitrano *et al.* (2003) quienes concluyen que la adición de pequeñas cantidades de plasma seminal es capaz de bloquear el proceso de unión.

En el proceso de unión del espermatozoide al ADN intervienen unas proteínas de 30-35 KDa (Zani *et al.* 1995) y se ha identificado un factor inhibitorio (determinado como IF-1) tanto en el plasma seminal como en la superficie del espermatozoide del erizo de mar (Lavitrano *et al.* 1992; Zani *et al.* 1995), que antagoniza la unión del ADN exógeno a las mencionadas proteínas, ejerciendo una poderosa protección del espermatozoide. En presencia de los factores de inhibición, las proteínas de superficie que unen el ADN pierden dicha capacidad (Zani *et al.* 1995). Sin embargo, en ausencia de IF-1, estas proteínas son capaces de interactuar con el ADN, y dichos complejos introducen el ADN en la célula mediante las moléculas de CD4 (Lavitrano *et al.* 1997b). Estos experimentos enfatizan en que es de vital importancia la eliminación por

completo del fluido seminal lo antes posible tras la recogida del eyaculado (Lavitrano *et al.* 2003).

Aunque Lavitrano *et al.* (1992) y Zani *et al.* (1995) han descrito la presencia de proteínas inhibitoras de la unión del ADN y el espermatozoide, poco se sabe de su estructura y su función de forma precisa. Es por tanto necesario ahondar en el estudio de estas proteínas del plasma seminal para poder conocer el proceso de la unión, las diferencias en la concentración de estas proteínas en los diferentes verracos, etc.

Los porcentajes de unión de los espermatozoides porcinos al ADN descritos en la bibliografía científica varían ampliamente. Así, Castro *et al.* 1991 encuentran que solo el 0.3% de los espermatozoides de cerdo se unen al ADN, mientras que Camaioni *et al.* (1992) reportan hasta un 78% de unión. Niveles intermedios entre 30% (Horan *et al.* 1991) y 12-17% (Gandolfi *et al.* 1996) son también encontrados en la literatura. Una posible causa de estas discrepancias entre resultados podría deberse a la eliminación o no completa del plasma seminal que modularía el porcentaje de unión, junto con diferencias en los animales empleados y en las condiciones experimentales.

Posteriormente se confirmó que también existían diferencias significativas en el grado de unión según el **macho** utilizado. Los espermatozoides procedentes del macho 257 presentaron un mayor porcentaje de unión en relación a los otros machos utilizados. En los primeros estudios realizados en relación con la SMGT se utilizaron espermatozoides epididimarios de ratón, donde el animal donador sólo puede utilizarse en una única ocasión, mientras que en el caso de los animales domésticos es posible el uso de espermatozoides eyaculados y el animal puede utilizarse durante toda su vida reproductiva. La selección de los reproductores donantes de semen tiene particular importancia, ya que existen diferencias en la captación de ADN exógeno entre los diferentes machos, por lo que se deben elegir donantes eficientes (Lavitrano *et al.* 2003). Esta variabilidad entre machos a la hora de unir ADN puede ser debida a factores intrínsecos de los verracos (características de las membranas espermáticas, proteínas que facilitan la unión, etc.), o a factores extrínsecos como son la frecuencia de extracción, edad del donante, condiciones de explotación, etc., que de alguna forma afectan al semen e interactúan en el proceso con el ADN. Sin embargo, estos factores aún no han sido estudiados en profundidad ni definidos totalmente.

En cuanto el **efecto de la presencia del ADN sobre la calidad seminal**, se observó que la coincubación con el ADN exógeno no suponía una alteración de los parámetros seminales. Tales resultados coinciden con los descritos por *Chan* (2000), donde afirma que la presencia de ADN exógeno, al menos en mamíferos, no genera interferencias con los parámetros seminales, como la motilidad o motilidad progresiva, e incluso en algunos casos, los espermatozoides tratados mejoran sus características en relación a las células no tratadas. En la misma línea, *Alderson et al.* (2006) afirman que la motilidad de los espermatozoides de toro no se ve afectada por la presencia del ADN. Sin embargo, *Anzar & Buhr* (2006) encuentran una reducción significativa en el porcentaje de células viables medidas con SYBR-14/IP en las muestras bovinas incubadas con ADN frente al control (32% vs. 27%, $p < 0.01$). Al igual que *Gandolfi et al.* (1996), quienes describen que tras el lavado de los espermatozoides y su incubación con el ADN exógeno, sólo un pequeño porcentaje (5-20%) de los espermatozoides presentaban motilidad, y la calidad de esta era baja (0.5-3, en una escala arbitraria entre 0-5).

Por otra parte, como era de esperar, durante el tiempo de incubación creciente (0, 1 y 2 h) se produjo un descenso de la calidad seminal de todas las muestras, tanto las incubadas con ADN como las del grupo control. También encontramos que no existía una asociación significativa entre la calidad seminal y capacidad de unirse al ADN. *Lavitrano et al.* (2003) afirmaron que la habilidad para captar el ADN e interiorizarlo dentro del núcleo se correlaciona con la calidad seminal, sobretudo en términos de motilidad progresiva tras el procedimiento de lavado, de tal modo la motilidad debe ser de al menos un 80% inicialmente y no menos de un 65% al finalizar el proceso de lavado. Nuestros resultados en este aspecto no confirman los datos descritos por *Lavitrano et al.* 2003, por una parte esta diferencia puede ser debida al uso de una técnica diferente de evaluación de la unión (radiactividad vs. microscopía de fluorescencia) lo que hizo que el rango de unión al ADN variase en los diversos verracos estudiados desde el 9 al 67% en el caso de *Lavitrano*, mientras que en nuestro caso variaron en un rango mucho más reducido (del 3 al 26%). Por otra parte, la variabilidad en la motilidad espermática fue elevada en el estudio de *Lavitrano* (rango 15-75%) mientras que en este estudio los verracos mostraron una motilidad en todos los casos muy cercana al 70%. El hecho de que la variabilidad de ambos parámetros (motilidad y unión al ADN) sea reducida limita notablemente la posibilidad de encontrar correlaciones estadísticamente significativas.

5.1.1.2 Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides de origen epididimario

Los espermatozoides cuando atraviesan el epidídimo en su proceso de maduración sufren una serie de cambios, adquieren motilidad y las proteínas de superficie de sus membranas se ven modificadas. Diversas investigaciones han demostrado que las secreciones de epidídimo se unen específicamente a las membranas del espermatozoide durante la maduración y el proceso de almacenamiento que tiene lugar en este órgano (Cooper 1986). La unión de estas moléculas del epidídimo induce numerosos cambios en la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios. Estos factores denominados decapacitantes, por bloquear el proceso de capacitación (Sidhu & Guraya 1989), son susceptibles de enmascarar los sitios de unión de receptores iónicos o de activación celular. Estos factores se originan en los líquidos testiculares, epididimarios o seminales y protegen a los espermatozoides provocando la estabilización del acrosoma o inhibiendo la unión a la zona pelúcida.

Una vez conocida que la presencia de factores presentes en el plasma seminal puede boquear el proceso de unión al ADN, era necesario conocer si los espermatozoides epididimarios que no han estado en contacto con el plasma seminal presentaban diferente capacidad de unión al ADN. En los resultados obtenidos en nuestra investigación, los espermatozoides **epididimarios** presentan una capacidad de unión similar que los eyaculados (a los que se ha eliminado el plasma seminal) tanto en el grado de unión al ADN como en la viabilidad a lo largo de la incubación. Únicamente detectamos un mayor porcentaje de unión del ADN a las células vivas en el grupo epididimario que es detectado por la alta sensibilidad y repetitividad que aporta la citometría de flujo (Gillan *et al.* 2005). Sin embargo, entendemos que esa diferencia estadística (de un 1 a un 2%) tiene escaso valor biológico.

Al obtener una eficiencia similar al utilizar los espermatozoides epididimarios que los eyaculados tras el tratamiento de eliminación del plasma seminal en la capacidad de interacción con el ADN pone de manifiesto que el proceso de eliminación de proteínas del plasma es efectivo. Además, podríamos utilizar en un futuro este tipo de espermatozoides y congelarlos, y así poder usar el mismo macho en diversas experiencias sin que la variabilidad del verraco afecte a la repetitividad de los resultados. Antes debe comprobarse la eficiencia en la producción de cerdos transgénicos con el uso de estos espermatozoides epididimarios en las diversas aplicaciones reproductivas (inseminación artificial,

fecundación *in vitro* e ICSI) como se ha utilizado previamente en ratón (Lavitrano *et al.* 1989; Moreira *et al.* 2004, 2007).

5.1.2 Evaluación de la cinética de unión entre espermatozoides y el transgén

La posibilidad de conocer la cinética de unión es de gran importancia para su uso en posteriores aplicaciones, así por ejemplo, a la hora de realizar FIV, ICSI o inseminaciones, conoceríamos el tiempo de incubación óptimo para llevar a cabo dichas experiencias con la máxima eficiencia. El uso del citómetro de flujo nos proporciona grandes ventajas a este respecto, debido a que podemos analizar una gran cantidad de espermatozoides con una alta sensibilidad en un corto periodo de tiempo (500 cel/seg).

Los resultados de 6 machos diferentes analizados mediante el **citómetro de flujo**, muestran que en los primeros 15 minutos de incubación tiene lugar la mayor parte de unión con el ADN. Posteriormente existe un gradual aumento del porcentaje de unión hasta un máximo a los 120 min de incubación, y aumenta significativamente cuando es analizado a las 24 h. Como podemos observar, la cinética de unión que se produce en nuestras condiciones experimentales es similar a la obtenida en los trabajos de *Sperandio et al.* 1996 (*Figura 62A*) y *Lavitrano et al.* 2003 (*Figura 62B*) con espermatozoides de ratón, toro y cerdo, donde el mayor incremento en la unión se produce en los primeros 15 min de incubación aumentando progresivamente hasta los 30 min. Aunque estos autores utilizaron técnicas de marcado del ADN con radioactividad, que no permite conocer el porcentaje real de espermatozoides unidos al ADN, sino el total de ADN marcado y unido a las células. También se ha descrito la cinética de unión en espermatozoides humanos (Camanioni *et al.* 1992), siendo similar a la descrita en bovino y porcino, alcanzando la máxima unión a los 20 min de incubación con el plásmido.

Las diferencias en los porcentajes de unión que se producen a lo largo del periodo de incubación, sugieren la posible existencia de subpoblaciones de espermatozoides que son bioquímicamente y/o funcionalmente diferentes y por lo tanto son diferentes en su capacidad de unirse al ADN (Gandolfi *et al.* 1998).

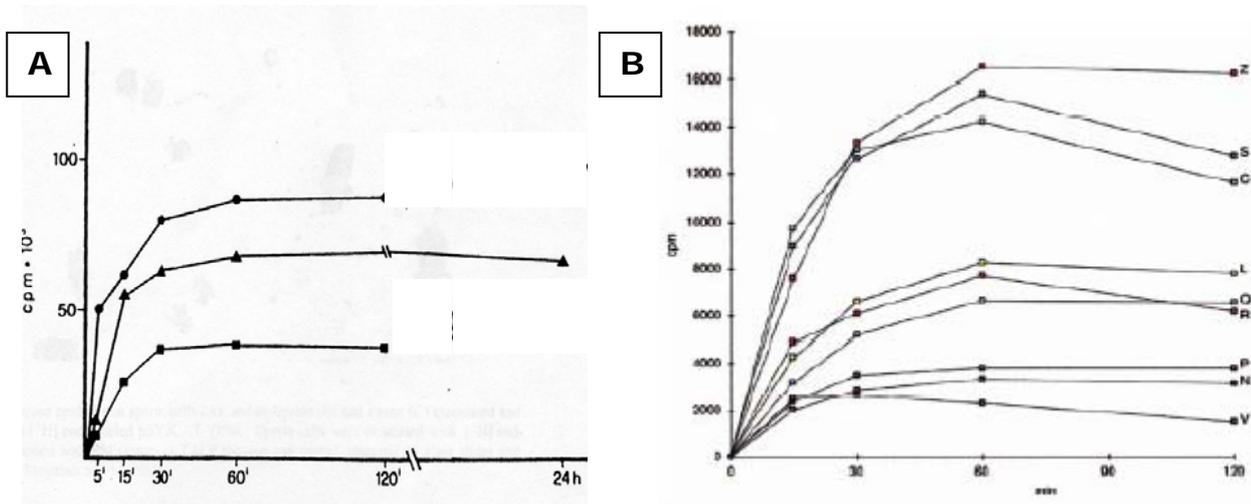
Cuando se analizó el **efecto del verraco** usado (6 machos diferentes) sobre la cinética de unión, se detectaron diferencias significativas dependiendo

del macho, aunque en todos los casos el patrón de la cinética de unión fue similar variando moderadamente el porcentaje de unión a lo largo del tiempo. Si observamos la *figura 62B* (Lavitrano *et al.* 2003), donde se comprueba la cinética y el porcentaje de unión de 9 machos diferentes, vemos que el comportamiento de los machos L, Q, P y N es similar a nuestros machos utilizados 318 y 1532, donde la unión se mantiene más o menos constante transcurridos 30 min tras la incubación. El macho Z de la figura muestra un aumento considerable de la unión más allá de los 30 min, tal y como sucede con nuestros machos 23 y 274, en este último caso (274) el aumento sigue siendo progresivo a lo largo del tiempo de estudio (120 min), y coincide con el patrón de unión que observan *Francolini et al.* (1993) al utilizar espermatozoides epididimarios de ratón.

Por último los machos S, C, R y V de la figura, tienen un pico máximo de unión a partir del cual comienza a descender dicha interacción, similar a lo ocurrido para los verracos 385 y 108. Este descenso podría estar relacionado o bien con una reducción de la señal fluorescente que se produce con el paso del tiempo, o bien a que en algunos animales las uniones de los espermatozoides con el ADN no son duraderas (uniones débiles) y pueden desligarse parcialmente con el paso del tiempo. Ésta última hipótesis es la más plausible, ya que estos resultados coinciden con los estudios de *Lavitrano et al.* (2003) que se realizaron con mediciones de radioactividad donde no es posible la pérdida de señal.

Por tanto, nuestros resultados confirman los establecidos por los trabajos anteriormente mencionados. Pero a diferencia del trabajo de *Sperandio et al.* (1996) donde a las 24 h la unión es similar que la producida a los 120 min (*Figura 62A*) medida por técnicas radioactivas, en nuestras condiciones experimentales el porcentaje de unión de los espermatozoides al ADN a las 24 h de iniciada la incubación es significativamente mayor que el medido a los 120 min de incubación. Esto puede ser debido a que las muestras no estaban fijadas, y pueden producirse alteraciones en las membranas espermáticas que favorezcan que el ADN pudiera unirse en mayor medida.

FIGURA 62. (a) Cinética de unión en diferentes especies a lo largo del tiempo: Espermatozoides epidídimo ratón (●); Espermatozoides eyaculados cerdo (▲); Espermatozoides eyaculados toro (■) (Sperandio *et al.* 1996). (b) Cinética de unión de diferentes verracos (Lavitrano *et al.* 2003).



En cuanto a los resultados obtenidos de las mismas muestras medidas con técnicas de microscopía y citometría, observamos que con la **microscopía de fluorescencia** el valor es ligeramente mayor que el obtenido en la medición con el citómetro de flujo, aunque estas diferencias no son significativas. Estas pequeñas diferencias pueden estar motivadas por diversas causas. Por una parte, en el citómetro de flujo, las muestras son sometidas a una alta presión que puede romper las uniones débiles de la superficie espermática al ADN, por otra parte en la observación microscópica se pueden presentar señales de fondo (uniones no específicas, falsos positivos) que aumenten el porcentaje de células positivas. Tampoco debemos de olvidar las limitaciones o errores asociados e inherentes a cada una de las técnicas.

La citometría de flujo ofrece unas grandes posibilidades porque permite emplear conjuntamente dos o más fluorocromos con lo que podemos evaluar al mismo tiempo la viabilidad y el grado de unión al ADN, permite evaluar un gran número de células por unidad de tiempo, y está exento de los problemas de seguridad que supone el uso de instalaciones radiactivas. Por todo ello, la citometría puede ser una gran herramienta para la evaluación de la capacidad de unión al ADN como previamente describió *Chang et al.* (2002) utilizando anticuerpos monoclonales.

5.1.3 Efecto del medio de incubación de los espermatozoides con el ADN exógeno: TALP vs. SFM vs. SFM-PS

Durante el proceso de la capacitación, algunos de los componentes de la superficie espermática son modificados o eliminados por secreciones del aparato reproductor femenino, entre estos procesos se produce la desulfatación del colesterol sulfato, desestabilización de la bicapa fosfolipídica y modulación de la fluidez de la membrana espermática, salida de colesterol, con aparición de zonas de alta fluidez pobres en proteínas y una serie de cambios en la permeabilidad iónica de la misma, ocasionando un aumento del Ca^{+2} , del AMPc y del pH intracelular (Töpfer-Petersen *et al.* 2000). Esta alcalinización del citoplasma del espermatozoide provoca la apertura de los canales de Ca^{+2} y por tanto, la entrada masiva de este catión que será esencial para el inicio de la reacción acrosómica (Langlais & Roberts 1985). En todos los espermatozoides de mamíferos evaluados, el Ca^{2+} es necesario para la capacitación (Fraser 1994) y para la exocitosis acrosomal (Yanagimachi 1994).

Teniendo en cuenta los trabajos de Lavitrano *et al.* (2002, 2003) en los que se sugiere que la fase temprana de capacitación espermática puede ser el momento óptimo donde se produce la interacción de los espermatozoides con el ADN. El objetivo en este apartado fue comprobar el grado de unión al ADN espermática de las células espermáticas incubados en dos medios diferentes, uno que induce la capacitación lenta (SFM), que presenta en su composición albumina y EDTA como agente quelante del calcio (Lavitrano *et al.* 2002), y el otro medio que induce una capacitación rápida (TALP) que contiene, entre otros componentes, altas concentraciones de calcio, albumina y bicarbonato, , que son promotores de la capacitación espermática en la especie porcina (Harrison *et al.* 1996).

Cuando los espermatozoides fueron incubados en un medio que favorece la capacitación (TALP), se observó un grado de unión al ADN mayor que cuando se incubó en medio SFM. Mientras que los mismos espermatozoides que se procesaron después de estar en contacto con plasma seminal (SFM-SP) presentaron menor grado de unión que el grupo control (SFM). Estos últimos resultados confirman lo observado en la *experiencia 1.1*, donde la presencia del plasma seminal inhibe la unión al ADN, bien sea por acción directa de algún factor presente en el plasma seminal como el factor IF-1 que bloquea los receptores de la membrana espermática necesarios para la unión con el ADN exógeno (Zani *et al.* 1995), o bien porque la presencia del plasma seminal de

cerdo reduce el proceso de capacitación (Vadnais & Roberts 2006). El efecto inhibitorio del plasma seminal (PS) en la capacitación debe ser el resultado de unión de proteínas del PS a la superficie espermática previniendo a las membranas de los cambios requeridos para la capacitación y/o inhibiendo las vías de transporte de la señal de capacitación a otros puntos de la célula (revisado por Vadnais & Roberts 2006), de ahí la importancia del plasma no solo porque bloquea los receptores sino porque su presencia disminuye la capacitación reduciéndose así la unión. Pero hasta la fecha no se tiene información precisa sobre las proteínas del plasma seminal implicadas en el efecto inhibitorio ni en el método de acción de las mismas.

Por otra parte se ha demostrado que el ADN exógeno se une al espermatozoide mediante interacciones iónicas, jugando un rol importante las cargas de las moléculas y las proteínas de superficie que actúan como receptores en la asociación del ADN con las células espermáticas (Lavitrano *et al.* 1992).

El proceso de capacitación podría ser el momento en el que se desestabiliza la membrana y se favorece el proceso de unión al ADN, tal y como afirman Lavitrano *et al.* (2003). Sin embargo, la relación entre el proceso de capacitación y el de unión al ADN, no ha sido estudiado hasta el momento con profundidad. En nuestro estudio, para comprobar si existía una relación entre el grado de capacitación y la capacidad de transportar ADN, se evaluó conjuntamente el desorden lipídico de las membranas y la viabilidad espermática de los grupos SFM y TALP. Se observó que los espermatozoides incubados en medio TALP, sufrieron un aumento significativo del desorden lipídico y finalmente un número de espermatozoides muertos mayor que en el grupo control. Además, se comprobó una relación directa entre la mortalidad espermática y el grado de unión, independientemente de la técnica empleada. Lo que pone de manifiesto la importancia de la membrana espermática en el proceso de unión.

En nuestro estudio, la unión incrementada de los espermatozoides incubados en TALP está asociada con una mayor muerte celular (porcentaje de células muertas mayor que en el control) y la mayor parte de esta unión se realiza a células muertas. No obstante, aunque el porcentaje de células unidas al ADN y viables es baja (como se demostró en la experiencia anterior) en el grupo TALP es ligeramente superior (poco más de 1% de diferencia), aunque esta información estadística parece tener poco valor biológico. Como hemos explicado anteriormente los espermatozoides recién eyaculados (intactos) no son capaces de fecundar y necesitan del proceso de capacitación y reacción acrosómica que

producen continuas alteraciones de la membrana que conllevan al fin último de la preparación del espermatozoide la habilidad de fecundar al ovocito (Yanagimachi 1994; Vadnais & Roberts 2006), si el espermatozoide después de sufrir la reacción acrosómica no encuentra el ovocito comienza el proceso de apoptosis que conlleva finalmente a la muerte de la célula espermática. Sin embargo, hasta el momento, y hace ya más de 40 años del descubrimiento de este prerequisite para la fertilización, los mecanismos que gobiernan la capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides aún son desconocidos y se encuentran influenciados por multitud de factores. Por lo que al incubar nuestros espermatozoides en TALP se produce el proceso de capacitación de forma rápida que conlleva la desestabilización de la membrana y la unión con el ADN exógeno, sin embargo, en las condiciones experimentales empleadas, tiene lugar de forma inmediata la reacción acrosómica que lleva a la muerte celular de casi el 50% de los espermatozoides.

La posibilidad de modular el proceso de capacitación de los espermatozoides abriría nuevas puertas para entender el proceso esencial de unión del ADN y la relación con el estado de la membrana.

5.1.4 Efecto del tratamiento espermático en la interacción ADN exógeno-espermatozoide

En un principio se afirmó que los espermatozoides muertos de ratón (Lavitrano *et al.* 1989) y de cerdo (Horan *et al.* 1991) no eran capaces de captar ADN exógeno, siendo únicamente los espermatozoides vivos capaces de efectuar este hecho. *Camaioni et al.* (1992) publicaron resultados similares no solo en ratón y en cerdo, sino también en humano. De manera que para este grupo de autores la unión e integración del ADN sólo se producía en células vivas y por tanto permitiría su utilización en sistemas donde es necesaria la competencia funcional de los espermatozoides (FIV, IA, etc.).

Pero fue en 1999, cuando *Perry et al.* utilizaron la técnica de SMGT asociada a la ICSI usando espermatozoides sometidos a tratamientos agresivos (tritón, congelación, etc.) e incubados con ADN, siendo estos espermatozoides muertos capaces de unir ADN exógeno y a su vez dar lugar a embriones y ratones transgénicos viables mediante ICSI. Recientemente *Anzar & Buhr* (2006) comprueban que los espermatozoides bovinos unidos al ADN son inmóviles (al igual que nuestras observaciones) aunque detectan que de un porcentaje del

27% de células vivas, el 46% estaban unidos al ADN. Por tanto el hecho de que si es posible la unión del ADN a células vivas o no y de qué manera se produce sigue siendo un tema controvertido.

Nuestro objetivo fue conocer si los tratamientos espermáticos afectaban al grado de unión de los espermatozoides al ADN y la viabilidad espermática, y en consecuencia determinarían la aplicabilidad de esta técnica.

Así, los espermatozoides **congelados-descongelados** presentaron una menor viabilidad y una mayor capacidad de unión al ADN que los espermatozoides frescos. Según *Anzar & Buhr* (2006), en espermatozoides de toro, la unión al ADN es mayor en semen congelado que en fresco ($49 \pm 1.8\%$ vs. $29 \pm 2.1\%$), obteniendo resultados de unión similares a los nuestros. La criopreservación induce cambios en la membrana plasmática de los espermatozoides debido a la baja temperatura y a una alta concentración de sales, que pudiera facilitar la unión e interiorización del ADN (*Anzar & Buhr* 2006). La unión del ADN en los espermatozoides congelados está aumentada en las células muertas, pero también a las células vivas congeladas. Se ha observado como espermatozoides eyaculados sometidos a un proceso de crioconservación manifiestan una desestabilización de sus membranas similar a los cambios que se producen durante la capacitación (*Harrison* 1997) denominado *capacitation like*. Igualmente se ha demostrado que el semen congelado permite la entrada de calcio a la célula más rápidamente que el semen fresco (*Parrish et al.* 1999), por lo que tal proceso podría producir una prematura capacitación. Por tanto, puede ser este momento preciso, en los pasos iniciales de la desestabilización de las membranas, cuando se produzca la unión a las células vivas.

Para la aplicación práctica de esta técnica de SMGT, sería muy aconsejable poder seleccionar verracos que por un lado permitieron utilizar con éxito el semen congelado-descongelado que alteraban sus membranas y transferir de forma eficiente el ADN exógeno; lo que posibilitaría crioconservar semen de animales que poseen espermatozoides con un alto grado de unión, y poder así utilizarlo en numerosas ocasiones para diversas investigaciones, garantizando la repetitividad de la experiencia y mejorando la eficacia de la técnica de SMGT.

Para poder estudiar la importancia de la integridad de la membrana espermática en el proceso de unión al ADN, utilizamos unos modelos experimentales donde se causaba la mayor alteración posible en las membranas

espermáticas utilizando procesos agresivos de permeabilización tanto físicos (**congelación rápida**) como químicos (**Tritón X-100**), asumiendo que la viabilidad de los espermatozoides es prácticamente nula. Comprobando que cuando se someten a los espermatozoides a estos procesos observamos como disminuye drásticamente la viabilidad pero conseguimos un grado de unión al ADN que supera el 90%. Confirmándose de esta manera la relación inversa entre viabilidad y capacidad de unión al ADN.

Recientemente se han desarrollado nuevos tratamientos para mejorar el transporte del transgén en los espermatozoides como la electroporación (Tsai *et al.* 1997), la incubación con complejos liposomas/ADN (Celebi *et al.* 2003), y el uso de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Shen *et al.* 2006). El **DMSO** se ha utilizado como un medio de transporte del ADN en su interacción con el espermatozoide; así Shen *et al.* (2006) utilizan los complejos ADN/DMSO incubándolos con los espermatozoides para obtener ratones y conejos transgénicos siendo un método simple y eficiente. El tratamiento con DMSO ha sido efectivo para la fecundación *in vitro* en conejo (Li *et al.* 2006). Sin embargo, en nuestra experiencia, el uso de DMSO no mejoró el porcentaje global de células unidas al ADN. Aunque mejoró la proporción de espermatozoides vivos y unidos al ADN, en unas proporciones muy limitadas (<2%), pero que no presentan ningún valor biológico.

Las diferencias en los resultados entre especies pudieran ser debidas a cuestiones metodológicas. En los trabajos con ratones y conejos se realiza un paso previo de enfriamiento de la suspensión a 4°C durante 10-15 min y los espermatozoides son incubados con los complejos ADN/DMSO durante el período de capacitación (Li *et al.* 2006; Shen *et al.* 2006). En el caso de la especie porcina no es posible realizar ese paso de enfriamiento sin dañar sensiblemente la célula espermática, por lo que este hecho podría ser unas de las causas de las diferencias en los resultados obtenidos en otros trabajos.

Por otra parte, el uso de la recombinasa RecA ha supuesto un aumento considerable en la producción de embriones transgénicos (Maga 2001; Maga *et al.* 2003; Kaneko *et al.* 2005). En nuestra investigación la incubación de los complejos **RecA:ADN** con los **espermatozoides** supuso un aumento del porcentaje de células muertas y un aumento del porcentaje de células unidas al ADN, con respecto al grupo control. En la misma línea, Moreira *et al.* (2007) cuando incuban espermatozoides congelados-descongelados de ratón con complejos RecA:ADN, encuentran que la mayoría de las células eran positivas

con señal fluorescente en sus acrosomas, región postacrosomal y estructuras en la pieza media. Mientras que cuando incuban espermatozoides de semen fresco sólo con ADN, solamente encuentran la señal en los espermatozoides inmóviles, y cuando se incuban frescos y el complejo RecA:ADN se marcan tanto los móviles como los inmóviles. Una posible explicación a nuestros resultados se deba a que RecA enmascara o disminuye la señal de fluorescencia del ADN, no pudiendo ser detectada en gran medida por el citómetro, lo que explicaría la discrepancia en los resultados con *Moreira et al.* 2007, donde la observación de los espermatozoides la realizan a través del microscopio de fluorescencia.

En términos generales, y para todos los tratamientos espermáticos estudiados se confirma el hecho de que la mayor parte de la unión de las moléculas de ADN y espermatozoides, se produce en células muertas o con alteraciones graves de la membrana. La hipótesis más verosímil es que la alteración o fractura de la membrana espermática favorezca la interacción con el ADN y permita fijarse a la región perinuclear.

Pero también es posible que la unión al ADN induzca la alteración y muerte del espermatozoide por la activación de las endonucleasas, que inducen el proceso de apoptosis asociada a la hendidura por donde se introduce el ADN y consecuentemente la célula muere (Maione *et al.* 1997). La apoptosis de la célula espermática podría ser un fenómeno natural para prevenir la transmisión de ADN exógeno a la siguiente generación (Anzar & Buhr 2006). Cuando las nucleasas son activadas por la presencia del ADN exógeno, catalizan la degradación localizada del ADN cromosómico del espermatozoide. La degradación del ADN y la modulación de la actividad de las nucleasas nos recuerdan a la apoptosis asociada al ADN descrita en las células somáticas (Spadafora 1998).

5.1.5 Efecto del tamaño del transgén sobre la unión con el espermatozoide

Teniendo en cuenta el modelo descrito hasta el momento para explicar el proceso de unión e interiorización del ADN en el espermatozoide (Spadafora 1998), el tamaño de las moléculas exógenas de ADN pudiera tener un efecto en la unión con los espermatozoides. Es razonable por tanto, esperar que las moléculas de ADN más pequeñas sean transferidas con mayor facilidad que moléculas de mayor tamaño, considerando los requerimientos físicos y energéticos que se necesitarían para captar moléculas de ADN de gran tamaño.

Sin embargo, los pocos datos disponibles que se tienen en este aspecto son contradictorios. Los resultados obtenidos en nuestras experiencias muestran que los espermatozoides porcinos tienen la misma capacidad de unión al ADN de tamaños de 5.7 Kpb y 10.3 Kpb. Por el contrario, un estudio con espermatozoides de erizo de mar encontró que la eficiencia de unir ADN exógeno es inversamente proporcional al tamaño de las moléculas en un rango que oscila entre 1.25-2.5 Kpb (Arezzo 1989), mientras que otro estudio posterior no encuentra relación entre el ADN capturado y el tamaño molecular entre un rango de 0.125-23 Kpb cuando utilizan espermatozoides porcinos (Horan *et al.* 1991).

En lo que a la producción de embriones transgénicos se refiere, nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos por *Moreira et al.* (2007), donde utilizan las mismas construcciones con tamaños de 5.7 Kpb y 10.3 Kpb. Con la incubación de los espermatozoides con estos genes y mediante la inyección en ovocitos de ratón, obtuvieron embriones y descendencia viva, sin ninguna diferencia significativa entre los genes utilizados (*Moreira et al.* 2007). Mientras que *Sperandio et al.* (1996) prueban en las especies porcina y bovina, como afecta la utilización de diferentes construcciones (pSV2CAT-5003 pb, pALu-8081 pb, pRSV-LT-9035 pb) en la producción de embriones transgénicos, siendo el de menor tamaño (pSV2CAT-5003 pb) el que da lugar a un mayor porcentaje de embriones transgénicos en ambas especies (porcino: 5.7% y en bovino: 22%). En principio una de las explicaciones a estos resultados sería que los diferentes tamaños de plásmidos utilizados juegan un importante papel siendo los de menor tamaño los que dan lugar a tasas mayores de transgénicos, estando favorecidas las moléculas más pequeñas de ADN. Sin embargo los análisis llevados a cabo *in vitro*, muestran que la asociación entre los espermatozoides y el ADN de los plásmidos utilizados se interiorizan todos de una manera eficiente en el núcleo espermático (*Sperandio et al.* 1996).

5.1.6 Localización del lugar de interacción entre el transgén y el espermatozoide

El ADN exógeno en la célula espermática puede ser transferido a los ovocitos y ser capaz de fecundarlos. Como ya hemos visto este fenómeno ocurre en diferentes especies y ha sido explotado en los últimos años para la generación de embriones y animales modificados genéticamente. La membrana plasmática de los espermatozoides juega un papel crucial: cuando la membrana está intacta, como ocurre en la interacción directa espermatozoide-ADN, la unión de

las moléculas de ADN a la superficie de la célula desencadena el mecanismo de interiorización y como consecuencia ocurre una transcripción inversa, formando mayoritariamente la generación de moléculas episomales de ADN (es decir, que el ADN exógeno no se encuentra integrado en el genoma del espermatozoide) (Spadafora 1998). Por contraste, la destrucción de la membrana, facilita la interacción directa con la cromatina de los espermatozoides incrementando la posibilidad de integración. Por otra parte, también es posible que se favorezca la unión a regiones accesibles en el ADN espermático (ADN fragmentado) que mediante los mecanismos de reparación del ADN que presenta el ovocito favorezcan los procesos de integración, como sugieren *Moreira et al.* (2007).

Esta integración puede ocurrir rápidamente en el núcleo espermático (“espermatozoides transgénicos”) o más tarde en los ovocitos, cuando el núcleo espermático se convierte en el pronúcleo masculino (Smith & Spadafora 2005). *Spadafora* (1998) publicó que el paso de integración del transgén en el ADN cromosómico del espermatozoide no es necesariamente un prerrequisito para obtener animales transformados genéticamente. De hecho, no hay ninguna evidencia directa contra la posibilidad que el plásmido sea transferido como tal al ovocito e integrado en el cigoto o en núcleos embrionarios en fases posteriores.

Varios han sido los métodos descritos y las técnicas utilizadas para determinar el lugar de interacción entre el transgén y el espermatozoide. Entre ellos destacan las autorradiografías, microscopio de fluorescencia, microscopio confocal, electrónico, etc. Igualmente son diversas las localizaciones donde se ha observado la unión del ADN: región postacrosomal, matriz acrosomal, acrosoma propiamente dicho, núcleo...

Nuestro objetivo fue localizar el sitio de unión del ADN exógeno en los espermatozoides porcinos y estudiar la influencia que tiene el tratamiento espermático sobre la localización del ADN. En los resultados obtenidos para esta experiencia, los espermatozoides frescos (intactos) se unen en menor proporción al ADN que los sometidos a un proceso de congelación y descongelación, y a su vez menos que los espermatozoides con alteraciones de sus membranas por congelación rápida. Tales resultados coinciden con los ya descritos en el *apartado 5.1.3.2* utilizando citometría de flujo.

Atkinson, en 1991, describe en bovino, ovino e insectos, cuatro sitios diferentes de interacción del ADN exógeno con las células espermáticas: (I) acrosoma (II) región ecuatorial (III) región subecuatorial (IV) parte final de la

cabeza, pero la mayor parte de la interacción ocurre en la región ecuatorial. En nuestra experiencia, hemos clasificado la localización del ADN en los espermatozoides en dos regiones: el acrosoma y la región postacrosomal. Por otra parte, *Anzar & Buhr* (2006), mediante el análisis con el microscopio de fluorescencia, encuentran 2 patrones de localización del ADN en el espermatozoide de toro, en la región apical del acrosoma y en la zona postacrosomal. Mientras que *Gandolfi et al.* (1996), utilizando espermatozoides porcinos y una técnica de evaluación similar con digoxigenina, utilizan una clasificación análoga.

En relación a la localización, observamos que cuando se usa el proceso de congelación rápida de los espermatozoides, hay una mayor tendencia de unión a la región acrosomal. Estos resultados están en concordancia con los descritos por *Perry et al.* (1999), quienes analizan mediante microscopía electrónica los espermatozoides de ratón con las membranas alteradas en diferentes grados (Tritón X-100, congelación rápida, congelación-secado) (*Figura 63*), observando que con estos tratamientos el lugar donde se producía mayor alteración en el espermatozoide era la región acrosomal, por lo que se deduce que los lugares donde las membranas están permeabilizadas se produce en mayor medida la unión. Además, observamos que cuando realizamos los tratamientos de congelación-descongelación y congelación rápida, la mayoría de los espermatozoides presentan los acrosomas alterados o reaccionados, estando el transgén localizado propiamente en el contenido acrosomal, por lo que la reacción acrosómica no tiene una influencia negativa en la habilidad de las moléculas de ADN para unirse a los espermatozoides de porcino (*Horan et al.* 1992b).

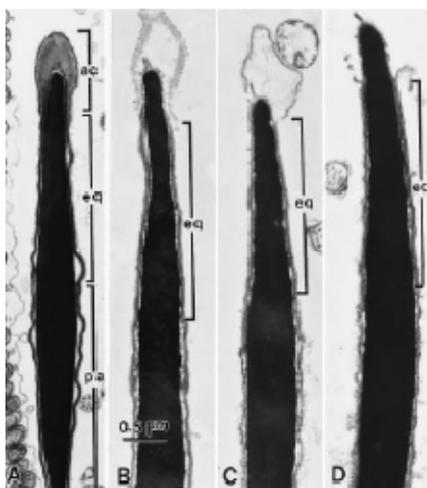


FIGURA 63. Imágenes de microscopía electrónica de espermatozoides de ratón intactos (a), o cuyas membranas han sido permeabilizadas con Tritón X-100 (b), congelación rápida (c), o congelación-deseccación (d). La alteración de las membranas se observa claramente en la zona apical del acrosoma (*Perry et al.* 1999).

Igualmente, el plásmido se encuentra localizado en la región postacrosomal, siendo mayoritaria esta unión en los procesos de congelación rápida al tener sus membranas un mayor grado de alteración. En otras investigaciones llevadas a cabo mediante autorradiografías de células espermáticas de ratón incubadas con el plásmido marcado con ^3H , se mostró que la radioactividad asociada al ADN con los espermatozoides se encuentra principalmente en el segmento subecuatorial de la cabeza (Lavitano *et al.* 1992), región que está implicada en la fusión de los gametos durante los pasos finales de la fecundación (Francolini *et al.* 1993).

Las diferencias encontradas en nuestra experiencia en los resultados tanto en el porcentaje de unión al ADN como en la localización de la unión asociado al uso de técnicas de revelado mediante un compuesto fluorescente (FITC) o mediante peroxidasa (HRP), nos induce a analizar con prudencia los datos revelados en la bibliografía.

El **microscopio electrónico** reveló la unión del ADN en el acrosoma, región postacrosomal y también asociadas a la membrana plasmática y matriz acrosomal, y sobre todo en aquellos espermatozoides que no presentaban alteración del acrosoma se encontraron cantidades significativas de gránulos de oro en la región apical, tal y como describen *Gandolfi et al.* (1996). Igualmente se observaron gránulos asociados a la región correspondiente al núcleo espermático, esta región nuclear se relaciona con el segmento ecuatorial de la cabeza espermática. Además, como ya hemos mencionado anteriormente, aquellos espermatozoides con la membrana acrosomal alterada, la unión del transgén se producía claramente en el contenido acrosomal. Otras estructuras como la cola y pieza intermedia presentaban escasos gránulos de oro, por lo que digamos que en un principio se encontraban desprovistas de los mismos. *Francolini et al.* (1993) utilizando el microscopio electrónico, mostraron que los espermatozoides de epidídimo de ratón y espermatozoides lavados de toro, el ADN aparecía localizado en la cabeza espermática, y se concentraba en la cabeza del espermatozoide en correspondencia con la parte posterior del área nuclear. Por el contrario, no encontraron cantidades significativas de ADN en la región acrosomal ni en la cola, y solo en algunas ocasiones en la región mitocondrial de la pieza intermedia. Estos mismos autores describen dos patrones diferentes de distribución: en la periferia del núcleo y en el interior del núcleo, pudiéndose encontrar en la misma célula los dos tipos de distribución. Por otra parte, *Huguet & Esponda* (1998) estudiando espermatozoides de rata, revelan que numerosos gránulos de oro aparecían sobretodo en el núcleo espermático, pero también asociados a la membrana plasmática y a la matriz acrosomal. Otras estructuras

espermáticas como mitocondrias, axonema o estructuras relacionadas con el axonema estaban normalmente desprovistas de gránulos.

5.2 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES TRANSGÉNICOS

La técnica de SMGT, como ya es bien sabido, se basa en la habilidad de los espermatozoides de unirse al ADN exógeno, y dar lugar a embriones y animales modificados genéticamente mediante inseminación artificial, FIV y/o ICSI (Lavitrano *et al.* 1989, 2002, 2003; Perry *et al.* 1999). En el proceso de fecundación el núcleo espermático sufre profundas remodelaciones comenzando con la descondensación de la cabeza espermática a través de un proceso de metilación/desmetilación, hasta la fusión de los genomas (McLay & Clarke 2003; Spinaci *et al.* 2004). En los cigotos de ratón, se han demostrado múltiples roturas de ADN en el proceso de descondensación de la cabeza espermática, siendo interpretadas como un proceso de transición hasta el ordenamiento cromatínico (Kiessling & Markoulaki 2000). En el mismo año, Seo *et al.* (2000), demostraron que la co-inyección de ADN exógeno con endonucleasas de restricción mejora la frecuencia de la integración del ADN en el genoma hospedador. Por lo tanto, los cambios conformacionales que se producen en el ADN de origen paterno podría permitir que el ADN exógeno, si se localiza en las proximidades del ADN espermático en el momento adecuado, integrado en el genoma del cigoto (Zannoni *et al.* 2006) utilizando el mismo mecanismo de reparación del ADN que presenta el ovocito en metafase II.

El objetivo principal planteado fue la producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos mediante FIV e ICSI. Entre los factores limitantes que afectan a la FIV porcina, nos encontramos básicamente con las complicaciones asociadas a la maduración *in vitro* de los ovocitos, a la polispermia y a los pobres rendimientos del cultivo embrionario (Kane 2003; Coy & Romar 2002). Mediante la introducción de la técnica de ICSI, el inconveniente de la polispermia queda solucionado, ya que un único espermatozoide se introduce en el interior del ovocito. Sin embargo, el porcentaje de blastocistos que se obtienen tras el cultivo de los cigotos, ya de por sí bajo mediante la FIV tradicional, se ve drásticamente disminuido después de la ICSI (Coy & Romar 2002).

En la revisión bibliográfica no encontramos evidencia alguna de la producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos mediante FIV, mientras

que ésta si ha sido posible mediante ICSI (Shim *et al.* 2000; Bolling *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003) aunque en estudios limitados.

5.2.1 Evaluación de la técnica transgénesis espermática mediante ICSI sobre el desarrollo de embriones transgénicos

Una de las mejoras que se han producido en los últimos años en el método de SMGT ha sido la introducción de la técnica de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Perry *et al.* (1999), publicaron por primera vez que cuando espermatozoides de ratón intactos o con las membranas alteradas son incubados con ADN foráneo, y posteriormente inyectados en ovocitos mediante ICSI, se pueden obtener animales transgénicos. La técnica de ICSI nos ofrece como gran ventaja el permitir utilizar espermatozoides sometidos a diversos tratamientos de permeabilización de sus membranas, que según los resultados de la experiencia anterior, resultan en un porcentaje mayor de unión al transgén. Por el contrario, los problemas de eficiencia que la ICSI presenta en algunas especies han impedido la aplicación de esta técnica en un número limitado de ellas. Hasta hoy en día, desde nuestro conocimiento, la técnica ICSI-SMGT únicamente se ha llevado a cabo en ratones, ratas, primates y cerdos.

5.2.1.1 Eficiencia de la técnica transgénesis espermática mediante ICSI utilizando semen intacto

En este primer apartado teníamos por objetivo comprobar dos hechos: (1) si la producción de embriones por ICSI se veía afectada por la incubación previa de los espermatozoides con el ADN, y (2) la eficiencia de la técnica ICSI-SMGT en la producción de embriones transgénicos. En cuanto a los resultados evaluados vimos que la producción de embriones no se vio afectada por la incubación previa de los espermatozoides con el ADN, obteniéndose tasas de división embrionaria y producción de blastocistos, así como un número medio de células por blastocisto, similares al grupo control. Nuestros resultados se ven avalados por los publicados por Nagashima *et al.* (2003), mostrando en su estudio que el desarrollo embrionario no se ve disminuido cuando utilizan espermatozoides porcinos incubados con construcciones EGFP.

En relación al desarrollo embrionario después de la ICSI, los resultados de división embrionaria temprana, así como el desarrollo de blastocistos y el número de células por blastocisto son similares a los obtenidos previamente en

nuestro laboratorio por *García-Roselló et al.* (2006) y son tasas de desarrollo embrionario muy reducidas. Diversos autores, que han empleado la técnica de ICSI en la especie porcina, han sugerido que la inadecuada maduración citoplasmática del ovocito puede ser la causa del bajo desarrollo embrionario posterior (Kolbe & Holtz 1999; Probst & Rath 2003). Otras razones para explicar esta baja eficiencia pueden encontrarse, al menos parcialmente, en la propia técnica de ICSI, como son los daños en la membrana plasmática del ovocito, la disrupción del sistema microtubular por el efecto mecánico de la inyección, etc. Estos problemas inherentes al empleo de esta metodología no pueden ser evitados en su totalidad.

En cuanto a la producción de embriones transgénicos nuestros resultados fueron muy similares a los descritos por *Perry et al.* (1999), donde al utilizar espermatozoides intactos de ratón obtienen un 26% de embriones transgénicos, y en nuestro caso fueron valores cercanos al 22%. Del mismo modo, *Chan et al.* (2000a, 2000b), obtienen un 36.4% de embriones transgénicos en mono "*Rhesus*". Si nos centramos en la especie porcina utilizando espermatozoides frescos y liposomas obtienen un 29.4% de embriones transgénicos (*Lai et al.* 2001). Las tasas de generación de embriones transgénicos obtenidos son compatibles con los porcentajes de unión al ADN que hemos medido por citometría de flujo en espermatozoides intactos y que se encuentran entre valores del 12-35%, dependiendo de la experiencia.

5.2.1.2 Eficiencia de la técnica de transgénesis espermática mediante ICSI utilizando diferentes tratamientos espermáticos

Es conocido que el daño de las membranas espermáticas por aplicación de ciclos de congelación-descongelación o la exposición a detergentes, es crucial para la mejora de la producción de descendencia de animales transgénicos (*Perry et al.* 1999). Estos procesos de alteración de las membranas posibilitan la interacción transgén-espermatozoide y pueden inducir pequeñas roturas en el ADN del espermatozoide que cuando se combinan con la reparación del ADN ovocitario pueden resultar en ratios mayores de integración del transgén.

En trabajos previos (*Kurome et al.* 2001; *Nagashima et al.* 2003) usan **espermatozoides congelados-descongelados** de porcino como vectores del ADN exógeno. Siendo el ratio de expresión de EGFP en los blastocistos obtenidos mediante ICSI de aproximadamente un 50%, resultados que son equivalentes a los obtenidos en nuestra experiencia (44.94±5.30%). Sin embargo otros trabajos

(Bolling *et al.* 2003), obtienen únicamente un 7.3% de embriones transgénicos utilizando semen congelado-descongelado. Además, debemos de tener en consideración que el porcentaje de unión del ADN a los espermatozoides fue 55.08 ± 1.79 , resultados en el mismo nivel que las tasas de expresión de la proteína en los embriones.

La utilización de semen congelado con los mismos niveles de eficiencia en transgénesis permitiría seleccionar un buen donante y usarlo cuando proceda.

Perry et al. (1999) describen tasas de transgénesis mayores cuando se utilizaron espermatozoides con las membranas dañadas que cuando las membranas estaban intactas (77% vs. 26%), alcanzando un 82% al utilizar semen sometido a un **proceso rápido de congelación-descongelación**. En la especie porcina, nuestros resultados muestran valores superiores al control cuando se tratan de este modo a los espermatozoides (53.06 vs. 84.09%), en la misma línea, *Lee et al.* (2003), describen resultados muy similares a los nuestros cuando utilizan el proceso de congelación rápida de los espermatozoides (81%). Estos datos están en coherencia con las tasas de unión medidos por citometría de flujo (93.76 ± 1.32). Sin embargo el desarrollo embrionario obtenido en relación al número de blastocistos, es considerablemente más bajo que el obtenido para el control (espermatozoides intactos), de ello cabe deducir que el proceso tan agresivo de alteración espermática podría dañar el ADN propio del espermatozoide, produciéndose fragmentaciones severas del mismo que se pueden traducir en un bajo desarrollo de blastocistos en las fases posteriores.

Cuando utilizamos **Tritón X-100**, como agente químico para permeabilizar las membranas, se obtuvieron tasas de expresión más bajas de lo esperado (29.03 ± 8.29), teniendo en cuenta que el grado de unión al ADN de estos espermatozoides era superior al 90%. Mientras que *Perry et al.* (1999), obtuvieron un 64% de embriones transgénicos en ratón cuando utilizaron el tritón como tratamiento espermático, y *Shim et al.* (2000) describen que el 59% de los embriones porcinos expresan la GFP utilizando tratamientos similares.

Estos resultados podrían estar relacionados con un posible efecto tóxico ejercido por el Tritón X-100 tanto en el espermatozoide como en el ovocito. Este tratamiento puede tener un efecto directo sobre la estructura del espermatozoide que lleva asociadas fracturas en el cromosoma paterno en el interior del cigoto. Por otra parte, la alta permeabilidad que se produce en la membrana puede

permitir la unión de grandes cantidades de ADN que desencadenen un efecto tóxico (Maione *et al.* 1997; Sciamanna *et al.* 2000).

Por otra parte, es conocido que el Tritón X-100 no es un producto natural y podría ser tóxico para los ovocitos, y como alternativa se podría utilizar la lisolecitina para alterar las membranas espermáticas, ya que es un producto natural de las células que produce una hidrólisis de las membranas fosfolipídicas no siendo tóxico para los ovocitos (Moisyadi *et al.* 2007). Otra posible solución a este hecho sería el uso de Tritón X-100 a concentraciones menores, que dé lugar a un menor daño espermático y poder así aumentar el desarrollo embrionario.

El hecho de que numerosos trabajos publicados muestran la transmisión del transgén, y que solo algunos muestren la integración, sugiere que deben existir factores desconocidos que han provocado esta interacción. La más clara evidencia de integración ha sido demostrada mediante ICSI-SMGT. La membrana plasmática del espermatozoide juega un papel crítico, cuando la membrana está intacta, como ocurre en la interacción con el ADN, se debe producir la unión de moléculas de ADN a la superficie espermática y finalmente debe conllevar un complejo mecanismo de interiorización. Por contra, el uso de espermatozoides con membranas alteradas, facilitaría la interacción directa con la cromatina espermática incrementando la probabilidad de integración.

Como ya hemos indicado anteriormente, el desarrollo de embriones porcinos *in vitro* es reducido y aún más cuando se utiliza la técnica de ICSI. Los tratamientos con Tritón X-100 y congelación rápida, de los espermatozoides incubados con EGFP y fecundados mediante ICSI mostraron resultados muy reducidos probablemente asociados a alteraciones cromosómicas en los cigotos formados (Szczygiel *et al.* 2003); por lo que dichos autores hipotetizaron con la posibilidad de que este efecto negativo sobre el desarrollo embrionario está asociado con anomalías cromosómicas, y que estas aberraciones están inducidas por la presencia del ADN exógeno mismo o por condiciones usadas para aumentar la integración del ADN.

Los embriones transgénicos obtenidos mediante ICSI presentaron diverso grado de mosaicismo, es decir no todas las blastómeras del embrión expresaban el gen EGFP. En este sentido, *Bolling et al.* (2003) describen que la mayoría de los embriones porcinos examinados (11/17) para la proteína GFP eran mosaicos. Por otra parte, *Perry et al.* (1999), demuestran que los embriones de ratón que contienen algunas células negativas para la GFP tienen una mayor capacidad de

llegar a término que aquellos embriones que todas sus células son positivas para GFP. Una de las limitaciones de la microinyección pronuclear, según *Robl et al.* 2007, se debe a la integración al azar del transgén con un alto número de copias del plásmido por lo que resulta muy variable la expresión. Mientras que según *Kurome et al.* 2006, la transgénesis mediada por ICSI es un método que produce un número menor de casos de mosaicismo que cuando se utiliza la microinyección pronuclear.

En los embriones donde todas las blastómeras expresan el transgén la integración debe ocurrir en el estadio pronuclear, antes de que la replicación del ADN tenga lugar. Sin embargo, en los embriones con mosaicismo, la integración probablemente debe estar retrasada por el procedimiento de ICSI. El grupo de *Perry* observó que la integración del transgén en el ratón se retrasaba solo cuando el ADN exógeno fue co-inyectado con cabezas espermáticas y no cuando el ADN fue inyectado solo. Además, *Bolling et al.* (2003), cuando compararon la división en los dos grupos de ICSI, observaron que el desarrollo fue menor en ICSI+GFP que en ICSI-GFP. Del mismo modo, *Perry et al.* (1999) observaron un descenso en el desarrollo embrionario en relación a la proporción de embriones que contienen blastómeras fluorescentes. El mecanismo de maduración de la proteína GFP requiere de oxidación por O₂, y la liberación de peróxido de hidrogeno que podría explicar el deterioro del desarrollo embrionario temprano con altos niveles de expresión de la GFP.

5.2.1.3 Efecto del uso de la recombinasa RecA sobre el desarrollo de embriones transgénicos por ICSI

Nuestro objetivo fue comprobar si el uso de RecA ejerce un efecto protector sobre las cadenas ssADN, traduciéndose en una mejora en el desarrollo embrionario y en la tasa de producción de embriones transgénicos mediante ICSI, al incubar los espermatozoides con complejos RecA:ssADN. Los resultados obtenidos confirmaron que el desarrollo embrionario no se vio afectado por el uso de RecA pero sí supuso una mejora considerable en el porcentaje de embriones transgénicos producidos. Es de reseñar que en 7 de los 9 replicados el 100% de los embriones fueron transgénicos. Por lo que se confirman las ventajas que aporta el uso de la proteína RecA cuando se fecunda por ICSI (*Kaneko et al.* 2005; *Moreira et al.* 2007).

El mecanismo de acción de este sistema debe ser diferente y de un modo aún no bien conocido, ya que los resultados obtenidos al medir la unión del

espermatozoide con los complejos RecA:ssADN los valores medios que obtuvimos fueron de 24.69 ± 0.70 , datos muy por debajo de los resultados obtenidos mediante ICSI. La eficiencia de la transgénesis podría incrementarse mediante la conjunción entre el transgén y recombinasas capaces de mediar el proceso de integración. La recombinasa RecA, de *E. coli*, es la proteína bacteriana mejor conocida. El proceso se inicia uniéndose a cadenas simples de ADN (ssADN) y formando un núcleo proteico helicoidal. Se ha comprobado que RecA protege las ssADN de la degradación creando una capa protectora durante su unión (Chow *et al.* 1986). Este mecanismo de protección también se ha verificado usando la microinyección pronuclear con complejos RecA:ssADN en las especies porcina y caprina (Maga 2001; Maga *et al.* 2003).

5.2.2 Evaluación de la técnica transgénesis espermática mediante FIV sobre el desarrollo de embriones transgénicos

La producción *in vitro* de embriones porcinos (que incluye MIV, FIV y CE) es una técnica ampliamente utilizada por los científicos, y aunque numerosos equipos llevan a cabo investigaciones en este área, el éxito de estas técnicas es todavía limitado. La eficacia de los sistemas de FIV en cerdo continúan siendo especialmente bajos, principalmente por dos problemas debido a las altas proporciones de polispermia, y al hecho de que aun hoy en día se tienen que obtener embriones mediante procedimientos *in vivo*, lo que no es rentable y a menudo impracticable (Coy & Romar 2002). Cheng *et al.* (1986), apuntaron que el principal problema de la FIV porcina era la polispermia y esta sigue siendo, hoy día, la mayor dificultad. La incidencia de la polispermia en ovocitos porcinos fecundados *in vivo* se encuentra entre unos rangos del 5 al 35% y pueden llegar al 65% en investigaciones *in vitro* (Mattioli *et al.* 1988; Sun & Nagai 2003). Sin embargo, el interés en la producción de embriones porcinos es un objetivo incuestionable por diferentes razones, incluidas la producción de animales transgénicos.

El primer trabajo publicado donde se emplea la FIV con espermatozoides porcinos incubados con el ADN (Horan *et al.* 1992b), no dio lugar a ningún embrión transgénico, solo evidencias de descondensaciones de las cabezas espermáticas en los ovocitos de porcino y de hámster libres de la zona pelúcida. Posteriormente, Lai *et al.* 2001 y Bolling *et al.* 2003, también intentaron sin éxito la producción mediante FIV de embriones porcinos modificados genéticamente. Por otra parte, Chan *et al.* (2000a, 2000b) no obtienen en primates ningún

embrión transgénico mediante FIV pero si por ICSI, como hemos mencionado anteriormente. Sin embargo, en otras especies como bovino si ha tenido éxito, pero con reducidos porcentajes de transgénesis (Gagné *et al.* 1991; Sperandio *et al.* 1996; Rieth *et al.* 2000).

Decidimos utilizar la recombinasa RecA como medida protectora del ADN exógeno frente a la actuación de posibles enzimas endonucleasas, comparándolo con el sistema de FIV tradicional con espermatozoides no incubados con plásmidos (control) y con presencia de EGFP sin RecA. Por lo que nuestros objetivos fueron: (1) si la producción de embriones por FIV se veía afectada por la incubación previa de los espermatozoides con el ADN, (2) la eficiencia de la técnica FIV-SMGT en la producción de embriones transgénicos porcinos, y (3) evaluar el efecto del uso de la proteína RecA sobre la eficiencia en el desarrollo embrionario y en la expresión del transgén.

La utilización de la fecundación *in vitro* (FIV) con espermatozoides incubados con el ADN exógeno no permitió la obtención de embriones que expresaran la proteína EGFP. Siendo estos resultados similares a los publicados anteriormente en porcino (Horan *et al.* 1992b; Lai *et al.* 2001; Bolling *et al.* 2003) y en el mono "*Rhesus*" (Chan *et al.* 2000a, 2000b) como ya hemos reseñado anteriormente. Pudiera ser que a pesar de no detectar la expresión de la proteína hubiera en algún caso integración del ADN, pero no nos fue posible evaluar este parámetro. En este sentido, en la especie bovina, Alderson *et al.* (2006) utilizan protaminas como protección del ADN exógeno de posibles lisis por las nucleasas, y realizando FIV no se obtuvieron expresión del gen EGFP en ninguno de los blastocistos analizados, sin embargo mediante PCR se mostró que entre un 10.2-14.6% de los blastocistos eran positivos para el plásmido. Cabe reseñar que el número de blastocistos positivos por PCR (Alderson *et al.* 2006) fue menor que el observado en otros trabajos de SMGT bovina (Shemesh *et al.* 2000; Reith *et al.* 2000), donde fue incubado considerablemente una menor concentración de ADN con los espermatozoides. Por otra parte, Chan *et al.* 2000a mostró que la expresión de la GFP podría no ser detectada en blastocistos de primate mediante microscopía de fluorescencia, pero si mediante inmunocitoquímica. Otra posibilidad que pudiera explicar estos resultados es que el plásmido esté integrado en el genoma pero se encuentre silenciado por mecanismos como la heterocromatización, como ha sido observado en la integración de otros genes (Henikoff 1998).

Para poder discutir los resultados obtenidos, podemos plantearnos dos hipótesis con dos premisas de partida, la primera de ellas, es que haya espermatozoides vivos a los que se una el transgén y puedan fecundar mediante FIV, y la teoría, que el ADN se una, en su mayor parte, a los espermatozoides muertos.

Si nos centramos en la primera posibilidad, varias pudieran ser las causas por las que no hemos obtenido resultados positivos en FIV-SMGT. Así, *Lavitrano et al.* (2002) desarrollaron un medio que contiene EDTA y está libre de Ca^{2+} en el cual el proceso de capacitación se produce lentamente en ausencia de plasma seminal. Con este medio libre de Ca^{2+} se reduce la probabilidad de que las endonucleasas endógenas actúen sobre el ADN exógeno. Para permitir la capacitación en ausencia del plasma seminal y de Ca^{2+} , ajustaron la temperatura (17°C) y la cantidad de BSA (6 g/l) añadida al medio, dos factores que pueden modular el proceso de capacitación (*Lavitrano et al.* 2003). Sin embargo, el calcio y el ion bicarbonato son fundamentales para el proceso de capacitación espermática en la especie porcina (*Harrison 1997*) y se ha demostrado como un incremento en el medio de Ca^{2+} aumenta tanto las penetraciones espermáticas como el número de espermatozoides por ovocito penetrado (*Abeydeera & Day 1997*). Además de promover la capacitación, se ha observado que el calcio acelera el proceso de penetración (*Yamauchi 1998*) y no se han conseguido penetraciones en medios carentes de este ion. El medio de FIV utilizado en nuestros experimentos es el medio TALP que entre otros componentes contiene calcio (en forma de lactato cálcico), por lo que de acuerdo con esta hipótesis la presencia del calcio pudo inducir la actividad de las endonucleasas sobre el ADN exógeno. Por otra parte, los espermatozoides capacitados son los que pueden moverse libremente dentro de la matriz del *cumulus*, mientras que los no capacitados se unen a la superficie pero no pueden atravesarla (*Myles & Primakoff 1997*). Las condiciones experimentales empleadas podrían también llevar a que los espermatozoides capacitados y unidos al ADN sufrieran una rápida reacción acrosómica y ser por tanto, ineficaces para la fecundación.

Por otra parte, *Chan et al.* (2000a, 2000b) muestran, mediante el microscopio confocal, que la señal del ADN exógeno en el espermatozoide se pierde al contactar con la zona pelúcida cuando se fecunda mediante FIV, pero no ocurre esto con la técnica de ICSI. En la FIV, instantes después de la fusión del espermatozoide, se secreta el contenido de los gránulos corticales donde se incluyen enzimas que modifican la ZP en un proceso para prevenir la penetración espermática (*Stein et al.* 2004). Por lo que podríamos pensar que probablemente

la acción enzimática de la zona pelúcida y la membrana plasmática del ovocito actúen sobre el ADN exógeno de los espermatozoides alterando la interacción, siendo esta otra posibilidad por la que el éxito de SMGT-FIV se encuentra limitado. En estos mismos trabajos, *Chan et al.* (2000a, 2000b) afirman que la unión se produce mayoritariamente en la superficie del espermatozoide y que las proteasas del citoplasma del ovocito pueden jugar un papel importante en la disociación de la interacción espermatozoide-ADN.

La utilización de la proteína RecA no supuso una mejora en las tasas de desarrollo embrionario temprano con respecto al control (41% vs. 39%), pero sí frente al control de FIV utilizando semen intacto incubado con el ADN (25%). Pero en cualquier caso la producción de blastocistos fue similar en los 3 grupos.

Si nos planteamos la segunda hipótesis, donde el ADN se une en su mayoría a espermatozoides muertos, esta sería la causa de que no se produjeran embriones transgénicos, ya que los espermatozoides muertos o con viabilidad reducida no son capaces de fecundar por FIV. El porcentaje reducido de espermatozoides vivos que se unen al ADN podrían estar en desventaja frente a los no unidos en un sistema competitivo como es la FIV. Esta hipótesis quedaría avalada por los resultados obtenidos en nuestras experiencias anteriores, donde en la medición de la unión y la viabilidad espermática con el citómetro de flujo, el ADN se encontraba unido mayoritariamente a los espermatozoides con alteración de las membranas plasmáticas.

5.3 VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES Y LECHONES TRANSGÉNICOS

El objetivo de la tecnología de transgénesis es producir animales donde la incorporación del transgén sea estable, actuando estos animales como fundadores para producir descendencia que lleven el transgén (*Wheeler & Walters 2001*). Varios grupos han desarrollado con éxito la producción de cerdos transgénicos usando SMGT (*Lavitrano et al. 1997, 1999, 2002, 2003; Lai et al. 2001; Chang et al. 2002; Kurome et al. 2006; Yong et al. 2006*). Cada estudio se caracterizó por el método específico usado para inducir la unión del ADN con el espermatozoide y el método de fecundación.

En los estudios realizados por *Lai et al. (2001)* y *Chang et al. (2002)* se usaron complejos ADN-liposomas y anticuerpos monoclonales respectivamente,

como nexo de unión del ADN con el espermatozoide, mientras que *Kurome et al.* 2006 y *Yong et al.* 2006, utilizaron espermatozoides congelados para aumentar la interacción con el plásmido. Por otra parte, *Lavitrano et al.* (1997, 1999, 2002, 2003) simplemente incuban los espermatozoides con el ADN durante 2 h. En unos casos, se utilizó la inseminación artificial para la producción de animales transgénicos (*Lavitrano et al.* 1997, 1999, 2002, 2003; *Chang et al.* 2002), en otros se crearon embriones transgénicos *in vitro* mediante ICSI que luego se transfirieron a hembras receptoras (*Kurome et al.* 2006; *Yong et al.* 2006).

5.3.1 Evaluación de la obtención de lechones transgénicos por inseminación intrauterina profunda quirúrgica y no quirúrgica

En la actualidad, la inseminación artificial porcina es una técnica de amplia aplicación en todo el mundo. El protocolo habitual de inseminación artificial para cerdos requiere de un gran volumen de líquido (50-200 ml) y un gran número de espermatozoides ($5-10 \times 10^9$ células) por dosis de inseminación. Pero el número de espermatozoides puede ser reducido si son depositados en el lugar próximo a la fecundación, disminuyendo de esta forma su pérdida a lo largo de los cuernos uterinos (*Martínez et al.* 2001, 2002; *Fantinati et al.* 2005), ya que la unión útero-tubárica, junto con el istmo, actúan como un reservorio donde las células espermáticas mantienen su ultraestructura (*Rodríguez-Martínez et al.* 1990), motilidad, viabilidad y capacidad fecundante (*Suarez et al.* 1991).

La inseminación intrauterina profunda quirúrgica y no quirúrgica, además de permitir la reducción del número de espermatozoides a utilizar al depositar los espermatozoides cerca del lugar de fecundación, se minimiza la posible competencia que pudiera existir entre espermatozoides que transporten el transgén y los que no lo hacen. Recientemente se ha desarrollado una técnica de inseminación intrauterina profunda no quirúrgica mediante un catéter especial (*Martínez et al.* 2002) que puede ser usado para depositar un pequeño número de espermatozoides en el cuerno uterino, obteniendo buenos ratios de fecundación y de tamaño de la camada. Por otra parte, la inseminación por laparotomía quirúrgica cerca del oviducto ha mostrado buenos resultados con semen fresco (*Krueger & Rath* 1999, 2000) y congelado (*Polge et al.* 1970), de manera que se pueden obtener, mediante esta técnica, unas tasas de fecundación cercanas al 90% (*Fantinati et al.* 2005).

Con la **inseminación no quirúrgica** mediante la sonda intrauterina profunda, obtuvimos un porcentaje de éxito de gestación de un 75% con un tamaño de camada medio de 7.3 lechones. Estos resultados son similares a los logrados por *Martínez et al.* (2001), quienes utilizando la misma concentración espermática (15×10^7), obtuvieron un 86% de cerdas gestantes con un tamaño de la camada de 9.7, datos que a su vez se asemejan al uso de la inseminación cervical convencional (86% de gestación, 9.97 lechones/cerda) (*Martínez et al.* 2001).

Sin embargo, cuando analizamos la expresión y la integración del transgén no encontramos evidencia alguna de las mismas en ninguno de los 22 lechones obtenidos. Los resultados logrados podrían confirmar que las células espermáticas, en nuestras condiciones experimentales, son capaces de unirse al ADN mayoritariamente cuando su membrana esta alterada y sólo un número muy reducido de las células viables son capaces de unirse al ADN exógeno. Por tanto, la posibilidad de obtener lechones y embriones modificados genéticamente es muy reducida mediante inseminaciones. Nuestros resultados son equivalentes a los obtenidos por *Gandolfi et al.* (1996), donde inseminaron 35 hembras obteniendo un total de 126 lechones. Ninguno de los lechones mostró signos de incorporación de ADN exógeno en ninguno de los tejidos analizados mediante PCR y *Southern Blot*. Pero por el contrario, ese mismo año *Sperandio et al.* inseminaron 10 cerdas con semen incubado con el plásmido pSV2CAT dando lugar a un total de 82 lechones, de los cuales 5 fueron transgénicos (6.1%) y un 5.7% de los blastocistos analizados. Sin embargo, el éxito más relevante obtenido en la producción de cerdos transgénicos mediante SMGT-IA ha sido descrito por *Lavitrano* en diversos trabajos (*Lavitrano et al.* 1997, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2003, *Smolenski et al.* 2007), donde han inseminado cerdas prepúberes con semen (1×10^9 espermatozoides/hembra) previamente incubado 2 h a 16°C con ADN que contenía la construcción hDAF, obteniendo una tasa de integración de transgén del 80% y transmitido a la descendencia.

Al aplicar **inseminaciones quirúrgicas**, al igual que ocurrió con las inseminaciones no quirúrgicas, cuando analizamos los blastocistos recogidos a los 6-7 días tras la inseminación, ninguno de ellos expresó la proteína EGFP. El número medio de cuerpos lúteos por cerda fue de 10.50 ± 2.90 , con un ratio de recogida de un 11.90% (un total de 5 embriones, todos ellos en estadio de blastocisto), siendo el porcentaje de embriones normales desarrollados del 100%, con una alta calidad en cuanto a su desarrollo (dos de ellos tenían más de 400 células). Es sabido que la calidad embrionaria, medida por el número de

células por embrión, es mayor en aquellos embriones producidos *in vivo* que los obtenidos *in vitro*. Así, *Wang et al.* (1999), al comparar la calidad embrionaria en blastocistos de 6 días obtenidos *in vitro* e *in vivo*, encontraron que el número de células por blastocisto era muy superior en estos últimos (164.5 vs. 37.3).

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por *Fantinati et al.* (2005), utilizando dosis de inseminación similares a las de este trabajo (1.5×10^8 espermatozoides/1.5 ml por cuerno), y aplicando laparoscopia en lugar de laparotomía. Tras inseminar un total de 5 hembras obtuvieron un porcentaje de blastocistos que expresaban EGFP del 80%. Posteriormente, aplicando esta técnica, *Webster et al.* (2005), obtienen cerdos multitransgénicos. En el análisis de la integración de los genes en los 18 lechones obtenidos, observaron que el gen EGFP estaba integrado en el 44% de la descendencia, mientras que los genes EBFP y DsRed2 estaban en más del 85%. En la misma línea, *Chang et al.* (2002) obtienen un 13% de cerdos transgénicos utilizando la inseminación oviductal quirúrgica, mediante el uso de anticuerpos que se establecen como nexo de unión entre el plásmido y el espermatozoide.

Una de las posibles causas del bajo éxito de obtención de embriones tras la inseminación quirúrgica puede deberse a la baja respuesta del tratamiento hormonal que mostraron las hembras, ya que si observamos los resultados en 3 de ellas al menos uno de los ovarios tuvo una respuesta hormonal muy escasa. Uno de los principales problemas en usar cerdas prepúberes como modelo experimental es la respuesta a la superovulación, la cual puede ser pobre y en algunos casos altamente variable y difícil de predecir (Brussow 2000). Aun así debemos tener en cuenta que el número de cerdas utilizado fue bajo (solamente 4 cerdas) obteniendo únicamente un total de 5 embriones, y aunque la respuesta hormonal en alguno de los casos no fue correcta, en cualquier caso la técnica de recolección fue ineficiente dado el bajo número de embriones recogidos en relación al número de cuerpos lúteos visualizados.

Diversos autores han demostrado que la técnica de SMGT es efectiva utilizando inseminaciones artificiales ya sean quirúrgicas o no, pero no ocurre lo mismo bajo nuestras condiciones experimentales. Estos resultados podrían estar relacionados con algunos factores que a continuación intentaremos apuntar. Los primeros factores a tener en consideración serían los relacionados con los espermatozoides. Las diferencias observadas en el grado de unión al ADN que presentan los diferentes animales estudiados podría sugerir que haya diferencias en el proceso de unión motivados por diferencias en las proteínas implicadas en la interrelación con el ADN, como ha sido estudiado en el ratón por *Lavitrano et*

al. (1997). Según estos autores, el proceso de unión está mediado por proteínas del tipo CD4 y del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC). Por tanto, si estas mismas proteínas fueran las mediadoras del proceso en la especie porcina las diferencias en la expresión podrían ser las responsables de las diferencias en los resultados. Del mismo modo, factores extrínsecos también podrían estar relacionados, así la presencia de proteínas del plasma seminal (Lavitrano *et al.* 1992; Zani *et al.* 1995), la cantidad de ADN unida al espermatozoide (Maione *et al.* 1997; Sciamanna *et al.* 2000), modificaciones en el proceso de capacitación y las alteraciones de la funcionalidad de la membrana entre otros factores podrían modular el momento de la unión al ADN, el porcentaje de células viables unidas al ADN y finalmente determinar el éxito o el fracaso en la producción de animales transgénicos por esta vía.

Otra posibilidad del bajo rendimiento en las inseminaciones pudiera ser por el efecto de la heparina secretada por las células epiteliales del útero la cual puede competir con el ADN foráneo por los receptores de la superficie espermática (Sperandio *et al.* 1996), como sucede *in vitro* (Lavitrano *et al.* 1992).

En cualquier caso, es necesario profundizar en el estudio de los diferentes factores que afectan al proceso para poder comprender el mecanismo de acción y las posibilidades que se presentan para poder modificarlos.

5.3.2 Evaluación de la obtención de lechones transgénicos por transferencia de embriones de manera quirúrgica

En los últimos años los cerdos transgénicos han sido indispensables en el campo de la biomedicina y empleados en varias áreas de la investigación, (Petters & Sommer 2000; Niemann *et al.* 2003; Prather *et al.* 2003). Sin embargo, es necesario disponer de una metodología eficiente para producirlos y la microinyección pronuclear no lo es. Perry *et al.* (1999) publicaron un método alternativo para la producción de ratones transgénicos llamado ICSI-SMGT. Con este método se abren nuevas posibilidades para la generación de cerdos transgénicos, ya que esto podría reducir enormemente el coste de obtención de ovocitos (Kurome *et al.* 2006). Además, el uso de ICSI-SMGT ha permitido el desarrollo de un nuevo modelo activo de transgénesis en el cual se combina junto con recombinasas y transposasas para aumentar la eficiencia de la transmisión del gen exógeno. Esta técnica ha sido denominada "Transgénesis

activa" que implica que el transgén es incluido en el genoma del hospedador mediante enzimas durante la inserción del transgén en el ovocito (Shinohara *et al.* 2007).

No obstante, el éxito en el desarrollo y la aplicación de tecnologías como la transgénesis depende en gran medida de herramientas reproductivas básicas como MIV de ovocitos, FIV y CE. Sin la mejora significativa de estas tecnologías reproductivas, el desarrollo en la clonación y en la producción de animales transgénicos de granja estará limitada y será altamente costosa (Kane 2003).

El ADN exógeno, en nuestras condiciones experimentales, se une en su mayoría a espermatozoides muertos (solo un porcentaje muy bajo a células vivas), por lo que decidimos utilizar la ICSI y la transferencia de embriones como la única alternativa para poder obtener lechones modificados genéticamente. Cómo la mayor eficiencia en la obtención de embriones transgénicos *in vitro* se llevó a cabo mediante el uso de la proteína RecA, decidimos utilizarla para esta experiencia. De forma reiterada se ha puesto de manifiesto la ineficacia de los medios de cultivo *in vitro* para el desarrollo de los cigotos de la mayoría de las especies de mamíferos. Por tanto, para obtener la mayor viabilidad de los embriones decidimos ubicarlos en el oviducto de cerdas receptoras inmediatamente tras la microinyección, puesto que es el medio más fisiológico posible.

Tras las **transferencias de embriones** realizadas (un total de 4), obtuvimos una hembra gestante (25% de tasa de gestación). Solo unos pocos grupos de investigación en el mundo han sido capaces de obtener lechones mediante transferencia de embriones producidos por ICSI (Kolbe & Holtz 2000; Martin 2000; Lai *et al.* 2001; Nakai *et al.* 2003; Probst & Rath 2003; Naruse *et al.* 2005; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006; Katayama *et al.* 2007). Y el éxito es aun más limitado cuando se usa ICSI-MIV (Lai *et al.* 2001; Nakai *et al.* 2003; Naruse *et al.* 2005; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006; Katayama *et al.* 2007).

Cuando nos referimos a la técnica de ICSI-SMGT, nos encontramos con tasas de gestación y parto que varían entre el 17% obtenido por Yong *et al.* (2006) (una gestación de 6 transferencias realizadas) y un 40% conseguido por Kurome *et al.* (2006) (2 gestaciones de 5 transferencias realizadas), mientras que Naruse *et al.* (2005) obtuvieron un 33% (1/3 transferencias), por lo que nuestro resultado del 25% está en niveles similares a los obtenidos por otros

grupos. Como hemos dicho anteriormente uno de los principales problemas asociados al uso de cerdas prepúberes como receptoras (como es en nuestro caso) es la baja respuesta a la superovulación y en algunos casos altamente variable (Brussow 2000), de hecho en alguna de las hembras transferida el desarrollo de los folículos tras el tratamiento superovulatorio fue dispar en ambos ovarios. Otra cuestión a tener en cuenta son los problemas inherentes a la técnica de transferencia, el estrés producido en la cerda por el proceso quirúrgico, manipulación del oviducto y tejidos adyacentes, etc.

En total obtuvimos 8 **lechones**, de los cuales tres nacieron muertos (dos de ellos pocas horas antes del parto, y un tercero momificado). En general, en los estudios realizados en porcino mediante MIV-ICSI y transferencia de embriones, el número de lechones obtenidos es muy bajo y la viabilidad de los neonatos reducida. Los primeros éxitos descritos del nacimiento de lechones mediante transferencia de embriones producidos por ICSI, se utilizaron ovocitos madurados *in vivo* (Kolbe & Holtz 2000; Martin 2000; Probst & Rath 2003), siendo el mayor éxito obtenido el de 6 lechones en una misma camada (Probst & Rath 2003). Pocos son los grupos de investigación que han logrado obtener lechones mediante la utilización de ovocitos madurados *in vitro*. *Nakai et al.* en 2003 y *Kurome et al.* en 2006, obtienen 3 lechones. Recientemente, *Katayama et al.* (2007), obtienen el mayor número de lechones mediante MIV-ICSI, en una misma camada, siendo esta de 6 lechones. Y si tenemos en cuenta la combinación de las técnicas ICSI-SMGT, sólo se ha podido obtener un lechón por camada en los diferentes trabajos publicados (Lai *et al.* 2001; Naruse *et al.* 2005; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006). Por lo que el tamaño de camada obtenido en nuestra gestación, en nuestro conocimiento, es el más numeroso conseguido utilizando embriones de ICSI.

De los 8 **lechones** nacidos, dos de ellos (25%) eran **transgénicos**, integrando el transgén en la mayoría de los tejidos analizados (~75%). Por lo que queda demostrado, por primera vez, que es posible la producción de lechones transgénicos mediante MIV-ICSI-SMGT y el uso de una recombinasa RecA. En la especie porcina, *Yong et al.* en 2006, realizan 6 transferencias de ovocitos inyectados por ICSI con espermatozoides congelados procedentes de un verraco transgénico para la EGFP creado por *Cabot et al.* (2001), dando lugar a un solo lechón, que resultó ser transgénico para la EGFP. *Naruse et al.* (2005) únicamente obtienen un lechón de las 3 transferencias realizadas, que resultó ser transgénico para EGFP.

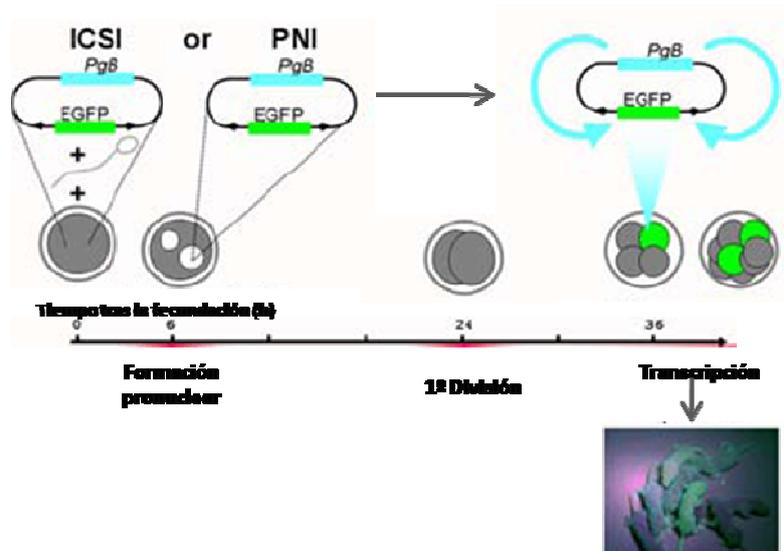
Según *Szczygiel et al.* (2003) la técnica de ICSI-SMGT en ratón es un método que permite producir animales transgénicos mediante inyección de los ovocitos con un rendimiento relativamente bajo, menos del 10%. Por otra parte, *Perry et al.* (1999) observaron que el desarrollo potencial de los embriones decrece según aumenta la proporción de blastómeras fluorescentes, y la co-inyección del ADN tiene un efecto negativo en el desarrollo post-implantacional. Estas observaciones sugieren que la ICSI-SMGT debe causar algún efecto negativo en el desarrollo embrionario (*Szczygiel et al.* 2003). El efecto negativo de la expresión de EGFP en el consecuente desarrollo de los embriones puede haber contribuido al fallo en las gestaciones en nuestro experimento, así como el descenso del número de lechones transgénicos. Este fenómeno fue igualmente observado por *Perry et al.* (1999), lo que se sugiere que para la obtención de lechones transgénicos para la GFP necesitan que sean transferidos un número elevado de embriones.

La **integración** del transgén se produjo en un 75% de los tejidos analizados, por lo que los lechones nacidos eran mosaicos. Pero es importante reseñar que órganos como hígado, riñón, bazo, estómago o intestino tuvieran integrado el transgén por el hecho de que son órganos de vital importancia sobre todo en el caso de su uso en xenotrasplantes. Los cerdos transgénicos en este estudio no sobrevivieron, lo que puede ser atribuido a un gran número de copias del transgén integrados en el lechón transgénico (*Naruse et al.* 2005). En este sentido, *Yamauchi et al.* (2007) observaron un claro incremento en la incidencia de carioplastos anormales tras la exposición de los espermatozoides al ADN foráneo (al igual que ocurre con los espermatozoides congelados que por sí causan fragmentación cromosómica). Estas roturas y alteraciones detectadas por análisis cromosómico son de relativa importancia para el desarrollo embrionario posterior.

La presencia de mosaicismo en el caso de RecA:ICSI, puede ser debida a la integración del transgén en el genoma hospedador tras la primera división celular (*Kaneko et al.* 2005) (*Figura 64*). En este sentido, *Moreira et al.* (2007), muestran porcentajes de mosaicismo mayores cuando emplean la recombinasa RecA que el grupo control de referencia y sugieren que es debido a que la recombinasa retarda el proceso de integración del transgén. Del mismo modo, *Shinohara et al.* (2007) afirman que uno de los problemas de la transgénesis activa es la presencia de mosaicismo, pudiendo solventar este problema mediante la inyección de ARNc para obtener la expresión de la transposasa en el

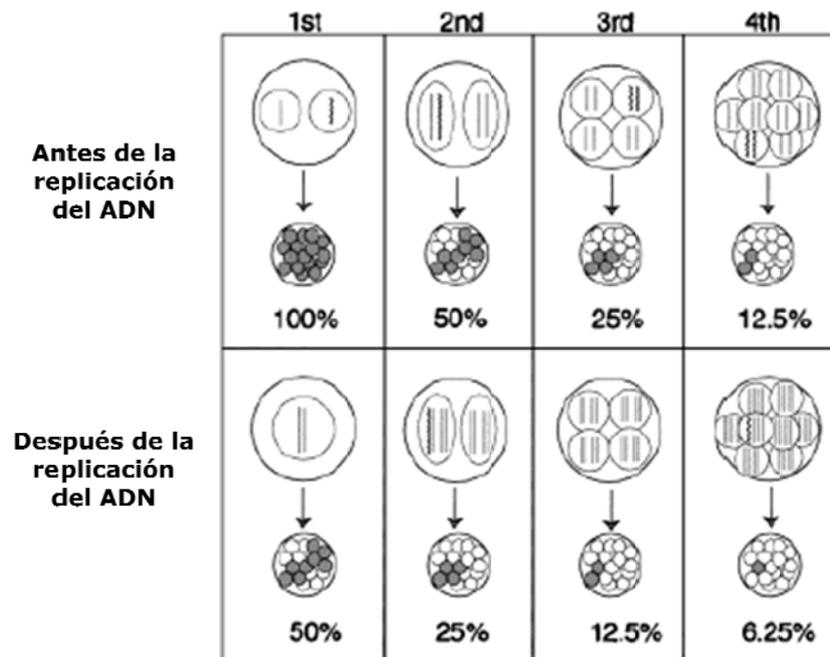
estadio embrionario de una célula. Mientras que otra de las situaciones que puede producirse es el silencio epigenético en algunos tejidos.

FIGURA 64. Todas las crías F_0 son mosaicos porque la transcripción para la introducción del plásmido no comenzó hasta después de la primera división celular (Shinohara *et al.* 2007).



Según Chan *et al.* (1999), el proceso de integración en los embriones que expresan GFP en el 100% de las blastómeras, ocurrió probablemente, en el primer ciclo celular, en el estadio pronuclear antes de la replicación del ADN. En los embriones que tienen el 50% de las blastómeras que expresan la GFP, pueden haber ocurrido dos cosas: 1) la integración del transgén ocurrió tras la replicación del ADN en el primer ciclo celular; o 2) antes de la replicación del ADN en el segundo ciclo celular en el estadio de dos células. Del mismo modo un embrión que exprese la GFP en un 75% de sus células, probablemente sea resultado de una combinación de numerosos eventos de integración. Por ejemplo, la integración debe haber ocurrido antes que la replicación del ADN en uno de los núcleos del embrión de 2 células, y el otro evento de integración ocurrió después de la replicación del ADN en el otro núcleo del mismo embrión (Chan *et al.* 1999) (Ver figura 65).

FIGURA 65. Predicción de la integración del ADN exógeno en los diferentes estadios de división celular (Chan *et al.* 1999).



En relación a la **expresión de la proteína**, obtuvimos una consistente expresión de EGFP, evaluada mediante *Western Blot*, en un 87.5% de los órganos y tejidos de los dos cerdos transgénicos analizados. Con estos resultados comprobamos que además de la integración del transgén en el genoma (demostrado mediante PCR), también se ha hecho patente la función de dicho gen mediante la expresión de la proteína que codifica.

El nivel de expresión que fue detectado mediante *Western Blot* no pudo ser confirmado con la observación directa con la lámpara de UV. Este hecho puede sugerir que la concentración de la proteína en los diferentes tejidos fue insuficiente.

Los únicos dos tejidos que mostraron integración del transgén en el genoma y que no expresaron la proteína verde fluorescente fueron intestino (lechón n° 039) y cerebro (lechón n° 040), esto puede ser debido al proceso de regulación de la actividad de los genes (capacidad de las células para controlar la expresión de los genes en un momento o situación determinados). En nuestro caso, puede deberse a que el promotor usado CMV dirige la expresión sólo a

determinados tejidos (en muchos casos hígado, bazo, gónadas...). Además, como es sabido, no todos los genes se expresan todo el tiempo en todas las células sino que existen mecanismos de activación y desactivación de genes que regulan las funciones y la diferenciación de las células. Si bien la expresión génica es un proceso muy complejo, existen lugares precisos donde la expresión de los genes puede verse regulada, son los llamados puntos de control. Las células eucariotas hacen uso de una gran variedad de mecanismos regulatorios entre los que podemos destacar: 1) regulación por cambios en el ADN, 2) regulación de la transcripción, 3) regulación del procesamiento del ARNm, 4) regulación de la traducción, y 5) regulación postraducción (Benavides & Guénet 2003).

En las células eucariotas, la traducción es un punto importante de regulación de la expresión génica, involucrando dispositivos muy variados. En algunos casos la traducción de una molécula de ARNm puede ser activada o desactivada por señales específicas. Además, el control del nivel de síntesis de proteínas puede ser regulado en distintos puntos, como la formación de los complejos ribosomas-ARNm (Benavides & Guénet 2003).

Igualmente se presentan discrepancias en cuanto a la detección del ADN y la expresión de la proteína. Así, en el lechón n° 039 en análisis por PCR de piel y corazón fueron negativos por PCR, mientras que hubo expresión de la EGFP en ambos tejidos. Este hecho pudiera deberse a problemas en el desarrollo de las técnicas de detección, o bien que la cantidad de ADN exógeno integrado en esos tejidos fuera mucho menor que en otros, y la amplificación no ha sido suficiente para detectarla, pero si se ha podido detectar por *Western Blot*. Otra hipótesis es que hubiera expresión de la proteína sin integración del ADN, como ha sugerido *Spadafora* (2007). Otra de las posibles causas pudo ser una degradación del ADN de las muestras de los tejidos antes de realizar la PCR, ya que el *Western Blot* fue repetido en 3 ocasiones y en todas ellas obtuvimos los mismos resultados. En cualquier caso aparecen numerosas bandas visibles en algunos de los tejidos analizados por *Western Blot*, no correspondientes al peso molecular de EGFP (29 KDa), son bandas no específicas y causadas probablemente por el alto contenido en proteínas (Lavitrano *et al.* 2002), o debido a uniones inespecíficas del anticuerpo secundario utilizado.

El nacimiento de lechones mediante ICSI, en este experimento, abre el camino para la producción de cerdos transgénicos mediante ICSI-SMGT usando ovocitos MIV y espermatozoides incubados con complejos RecA:ssADN. Debemos

seguir profundizando en el estudio de los factores que afectan a esta técnica para poder mejorar la eficiencia y aplicaciones de la misma.

NOVEDADES METODOLÓGICAS

- Es el primer estudio en el que se comparan diversos métodos de evaluación de localización y unión entre el transgén y los espermatozoides, usando diferentes tratamientos espermáticos.
- Además, es el primer trabajo donde se evalúa directamente la unión entre el espermatozoide y el ADN exógeno mediante el citómetro de flujo.
- Es el primer estudio en la especie porcina donde se evalúa por microscopia electrónica la localización del transgén usando espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos.
- Otra novedad es la utilización de la recombinasa RecA en la especie porcina, utilizando como sistema de fecundación FIV e ICSI. Así como la transferencia de ovocitos inyectados por ICSI a una hembra receptora, utilizando espermatozoides incubados con los complejos RecA:ADN.
- Es de destacar la gestación obtenida mediante transferencia de embriones de ICSI con semen incubado con los complejos RecA:ADN, debido al limitado éxito de esta técnica de fecundación ya que solo unos pocos grupos de investigación han obtenido descendencia viva con este método.
- Primeros lechones nacidos en España por transferencia de embriones fecundados por ICSI.
- La mayor camada de lechones del mundo mediante la transferencia de embriones creados por ICSI.
- Primeros lechones transgénicos nacidos en Europa y cuartos del mundo mediante la técnica de ICSI-SMGT, y los primeros combinando la utilización de una recombinasa (RecA) con ICSI-SMGT.
- El mayor número de lechones transgénicos en una misma camada creados por ICSI-SMGT.

INVESTIGACIÓN FUTURA

Las posibilidades y aplicaciones que ofrece la investigación en el campo de los animales transgénicos son muy amplias. Día a día numerosos estudios son realizados en prácticamente todo el mundo sobre animales modificados genéticamente, abriendo nuevos caminos a la investigación. Son diversas las líneas de estudio que se podrían llevar a cabo en el campo de cerdos transgénicos utilizando la capacidad que presentan los espermatozoides de transportar ADN exógeno, a continuación describimos algunas de estas:



Estudios específicos del espermatozoide en relación a la interacción con el transgén y las condiciones de co-cultivo:

- ✿ Un aspecto muy importante sería el poder trabajar solo con espermatozoides que llevaran el transgén incorporado. Este hecho se podría alcanzar separando la población de espermatozoides que transporta el transgén mediante la utilización del citómetro “*cell sorter*”, y así poder utilizar dichos espermatozoides para ICSI, IA, estudios espermáticos...
- ✿ De igual forma, es de importancia un estudio minucioso de la interacción de los espermatozoides que permitiera comprender el proceso de unión con el ADN haciendo uso del microscopio confocal y mediante el empleo de Dnasas para conocer qué proporción de ADN se encuentra unido al núcleo espermático y el que se encuentra en la superficie.
- ✿ También sería de interés el estudio del uso de diferentes concentraciones del transgén y ver cómo afecta este factor a la viabilidad espermática y la interacción con los espermatozoides mediante el uso del citómetro de flujo.

- ✿ Estudio de los espermatozoides epididimarios, ya que estos, al no haber estado en contacto con el plasma seminal no deberían tener los factores inhibitorios de la unión con el ADN, pudiendo ser un modelo para estudiar la interacción y una posible ventaja frente a los espermatozoides eyaculados.
- ✿ Introducir *in vitro* ADN marcado con fluorescencia en los epidídimos de cerdo obtenidos en el matadero, y evaluar la unión a las células espermáticas. Si fuera viable este método, podría aplicarse a los animales *in vivo* y utilizar los espermatozoides unidos a ADN mediante inseminación artificial.



Investigaciones que aumenten el rendimiento de la producción de embriones transgénicos *in vitro* y su posible posterior aplicación en condiciones *in vivo*:

- ✿ Utilizar espermatozoides incubados con ADN marcado con rodamina o fluoresceína para ICSI un microscopio invertido con fluorescencia. De este modo podemos asegurarnos de que el espermatozoide que introducimos en el ovocito está unido al transgén y nos permite seguir la evolución del transgén en el interior del ovocito/cigoto.
- ✿ El esfuerzo debería encaminarse a la mejora en los medios de cultivo embrionario en porcino, para así poder obtener mayor cantidad de blastocistos transgénicos de buena calidad y transferir estos a hembras receptoras con un mayor porcentaje de éxito.
- ✿ Explorar el uso de espermatozoides congelados en FIV e IA, ya que presentan un porcentaje mayor de células vivas y capaces de transportar ADN, por lo que tienen una mayor probabilidad de obtener embriones y lechones modificados genéticamente.



Estudios para la producción de lechones transgénicos en diversos ámbitos:

- ✿ Posibilidad de incubar los espermatozoides con diversos genes y crear en primer lugar, embriones multitransgénicos mediante ICSI, y posteriormente lechones por transferencia embrionaria.
- ✿ Producir cerdos con las modificaciones genéticas de nuestro interés y clonar estos a partir de sus células somáticas, utilizando ovocitos madurados *in vitro* enucleados y utilizados como células receptoras. Pudiendo así mantener líneas genéticas a partir de cerdos transgénicos.

CONCLUSIONES

- 1) Los espermatozoides porcinos son capaces de unirse al ADN exógeno, existiendo diferencias entre los diferentes machos analizados.
- 2) Mediante el citómetro de flujo podemos evaluar de una manera objetiva, rápida y eficaz la cinética de unión espermatozoide-ADN y la viabilidad espermática.
- 3) La presencia del plasma seminal inhibe parcialmente la unión entre el ADN y los espermatozoides.
- 4) La unión de los espermatozoides y el ADN es un proceso rápido, donde el mayor porcentaje de unión se produce en los primeros 15 minutos de coincubación.
- 5) Los espermatozoides pueden transportar con la misma eficiencia plásmidos de 5.7 Kpb y 10.3 Kpb.
- 6) Los diferentes tratamientos espermáticos afectan a la unión al ADN, siendo esta inversamente proporcional a la viabilidad espermática.
- 7) La localización del ADN exógeno en el espermatozoide se produce tanto en la región postacrosomal como en el acrosoma y en el área correspondiente a la región nuclear.
- 8) El uso de un sistema FIV-SMGT no permite la producción de embriones transgénicos porcinos en nuestras condiciones experimentales.

- 9) La producción de embriones transgénicos por ICSI-SMGT es un método eficaz en la especie porcina. Los diferentes tratamientos espermáticos afectan a la eficiencia de la técnica, siendo el tratamiento con RecA el que dio lugar a un mayor porcentaje de embriones transgénicos.
- 10) Las inseminaciones artificiales intrauterinas (quirúrgicas y no quirúrgicas) no permitieron, en nuestras condiciones experimentales, la producción de embriones y lechones transgénicos.
- 11) La producción de lechones mediante transferencia quirúrgica de ovocitos fecundados por ICSI es un método eficiente y viable en la especie porcina.

ABREVIATURAS

Ab-FITC: anticuerpo marcado con fluoresceína

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

BTS: medio *Beltsville Thawing Solution*

CE: cultivo *in vitro* de embriones

CMHII: complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

CMV: citomegalovirus

COCs: complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito

DAB: diaminobencidina

dbAMPc: dibutilil AMP cíclico

DCF: diacetato de carboxifluoresceína

DIG: digoxigenina

DMSO: dimetil-sulfóxido

dNTP: desoxi nucleótidos

DPX: medio de montaje anhidro para microscopía

EBFP: proteína azul fluorescente aumentada (*Enhanced Blue Fluorescent Protein*)

ECG: gonadotropina coriónica equina (*Equine Chorionic Gonadotropin*)

EGFP: proteína verde fluorescente aumentada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

FCS: suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*)

FITC: *fluorescein isothiocyanate*

FIV: fecundación *in vitro*

FSH: hormona folículo estimulante

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

HCG: gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Gonadotropin*)

HRP: *horseradish peroxidase*

IA: inseminación artificial

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmic Sperm Injection*)

IP: yoduro de propidio

MII: metafase II

MIV: maduración *in vitro*

Nº cels/blastocisto: número medio de células por blastocisto

NCSU: medio *North Carolina State University*

NGS: suero de cabra (*Normal Goat Serum*)

PBS: tampón fosfato salino de Dulbecco modificado (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PFF: fluido folicular porcino (*Porcine Follicular Fluid*)

PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)

PVA: alcohol polivinílico

PVP: polivinilpirrolidona

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SFM: medio de fecundación porcino (*Swine Fertilisation Medium*)

SMGT: transgénesis mediada por espermatozoides (*Sperm Mediated Gene Transfer*)

SSF: solución salina fisiológica

TALP: medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate*)

TBE: tris-borate-EDTA

TMGT: transferencia de genes mediante la red de testis (*Testis Mediated Gene Transfer*)

UV: ultravioleta

ZFx: *zinc finger protein X-linked*

ZFy: *zinc finger protein Y-linked*

ZP: zona pelúcida

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott A. **Geneticists prepare for deluge of mutant mice.** Nature 2004; 2:432:541.
- Abeydeera LR, Day BN. **Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa.** Biol Reprod 1997; 57:729-734.
- Alderson J, Wilson B, Laible G, Pfeffer P, L'Huillier P. **Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis.** Anim Reprod Sci 2006; 91:23-30.
- Aleksic I, Ren M, Popov A, Freimark D, Blanche C, Czer L, Trento A, Barath P. ***In vivo* liposome-mediated transfection of HLA-DR alpha-chain gene into pig hearts.** Eur J Cardiothorac Surg 1997; 12:792-797.
- Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. **Immunoglobulin genes in transgenic mice.** TIG 1 1985; 231-236.
- Amsterdam A, Lin S, Hopkins N. **The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos.** Dev Biol 1995; 171:123-129.
- Anzar M, Buhr MM. **Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa.** Theriogenology 2006; 65:683-690.
- Arezzo F. **Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information.** Cell Biol Int Rep. 1989; 13:391-404.
- Atkinson PW, Hines ER, Beaton S, Matthaei KI, Reed KC, Bradley MP. **Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa *in vitro*.** Mol Reprod Dev 1991; 29:1-5.
- Austin CR. **Observations on the penetrations of the sperm into the mammalian egg.** Aus J Sci Res 1951; 4:581-596.

- Bachiller D, Schellander K, Peli J, Ruther U. **Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells.** *Mol Reprod Dev* 1991; 30:194-200.
- Barnard CN, Wolpowitz A, Losman JG. **Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass.** *S Afr Med J* 1977; 52:1035-1038.
- Bayley LL, Nehlesen-Cannarella SL, Concepción W, Jolley WB. **Baboon to human cardiac xenotransplantation in a neonate.** *J Amer Med Assoc* 1985; 254:3321-3329.
- Bazer FW, Geisert RD, Thatcher WW, Roberts RM. **The establishment and maintenance of pregnancy.** In *Control of Pig Reproduction*. Eds DJA Cole and GR Foxcroft. Butterworth Scientific, London. 1982; 227-252.
- Bedford JM, Cooper GW. **Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs.** In *Membrane fusion*. Eds GL Nicholson and G Poste. Elsevier-North Holland. Amsterdam. 1978; 65-125.
- Bedford JM, Moore HD, Franklin LE. **Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals.** *Exp Cell Res* 1979; 119:119-126.
- Benavides FJ, Guénet Jean-Louis. **Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones.** Ed: Sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio (SECAL) y Universidad de Alcalá 2003.
- Benhamou PY, Moriscot C, Prevost P, Rolland E, Halimi S, Chroboczek J. **Standardization of procedure for efficient ex vivo gene transfer into porcine pancreatic islets with cationic liposomes.** *Transplantation* 1997; 63:1798-1803.
- Besenfelder U, Müller M, Brem G. **Transgenics and modern reproductive technologies.** In *The genetics of the pig*. Eds MF Rothschild and A Ruvinsky. CAB International 1998; 345-374.
- Biewenga JE, Destree OH, Schrama LH. **Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique.** *J Neurosci Methods* 1997; 71:67-75.
- Birnstiel ML, Busslinger M. **Dangerous liaisons: spermatozoa as natural vectors for foreign DNA?** *Cell* 1989; 57:701-702.
- Bleck GT, White BR, Miller DJ, Wheeler MB. **Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs.** *J Anim Sci* 1998; 76:3072-3078.
- Bolling LC, Pleasant RS, Butler SP, Velandar WH, Gwazdauskas FC. **An evaluation of sperm-mediated gene transfer in the pig.** *Transgenics* 2003; 4:77-86.
- Boulanger L, Mallet S, Chesne P, Chrenek P, Viglietta C, Houdebine LM, Renard JP. **Advantages and limits of using the ubiquitous expressed EF1alpha promoter for transgenesis in vivo and in vitro in rabbit.** *Transgenic Res* 2002; 11:88.
- Bowen RA, Reed ML, Schnieke A, Seidel GE Jr, Stacey A, Thomas WK, Kajikawa O. **Transgenic cattle resulting from biopsied embryos: expression of c-ski in a transgenic calf.** *Biol Reprod* 1994; 50:664-668.

- Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowski H. **Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization.** Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68:353-357.
- Brem G, Brenig B, Goodman HM, Sekden RC, Graf F, Kruff B, Springman K, Hondele J, Meyer J, Winnacker E-L, Kraublich H. **Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei.** Zuchthygiene 1985; 20:241-245.
- Brendel V, Brocchieri L, Sandler SJ, Clark AJ, Karlin S. **Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms.** J Mol Evol 1997; 44:528-541.
- Brenig B, Muller M, Brem G. **Gene transfer in pigs.** Proc 4th World Cong Genet Applied to Livestock Prod 1990; 12:41-48.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. **Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs.** Cell 1981; 27:223-231.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. **Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs.** Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:4438-4442.
- Brinster RL, Ritchie KA, Hammer RE, O'Brien RL, Arp B, Storb U. **Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice.** Nature 1983; 306:332-336.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. **No simple solution for making transgenic mice.** Cell 1989; 59:239-241.
- Brun B. **Studies on fertilization in *Xenopus laevis*.** Biol Reprod 1974; 11:513-518.
- Brussow KP, Torner H, Kanitz W, Ratky J. **In vitro technologies related to pig embryo transfer.** Reprod Nutr Dev 2000; 40:469-480.
- Bucchini D, Reynaud CA, Ripoché MA, Grimal H, Jami J, Weill JC. **Rearrangement of a chicken immunoglobulin gene occurs in the lymphoid lineage of transgenic mice.** Nature 1987; 326:409-411.
- Cabot RA, Kuhholzer B, Chan AW, Lai L, Park KW, Chong KY, Schatten G, Murphy CN, Abeydeera LR, Day BN, Prather RS. **Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector.** Anim Biotechnol 2001; 12:205-214.
- Cabrera M, Chan PJ, Kalugdan TH, King A. **Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues.** J Assist Reprod Genet 1997; 14:120-124.
- Camaioni A, Russo MA, Odorisio T, Gandolfi F, Fazio VM, Siracusa G. **Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa specific localization of DNA on sperm heads.** J Reprod Fertil 1992; 96:203-212.

- Cameron RDA, Durack M, Fogarty R, Putra DKH y McVeigh J. **Practical experience with commercial embryo transfer in pigs.** Aust Vet J 1990; 66:314-318.
- Camper SA, Saunders TL, Kendall SK, Keri RA, Seasholtz AF, Gordon DF, Birkmeier TS, Keegan CE, Karolyi IJ, Roller ML, Burrows HL, Samuelson LC. **Implementing transgenic and embryonic stem cell technology to study gene expression, cell-cell interactions and gene function.** Biol Reprod 1995; 52:246-257.
- Cappello F, Stassi G, Lazzereschi D, Renzi L, Di Stefano C, Marfe G, Giancotti P, Wang HJ, Stoppacciaro A, Forni M, Bacci ML, Turchi V, Sinibaldi P, Rossi M, Bruzzone P, Pretagostini R, Della Casa G, Cortesini R, Frati L, Lavitrano M. **hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer.** Transplant Proc 2000; 32:895-896.
- Carballada R, Esponda P. **Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa.** Exp Cell Res 2001; 262:104-113.
- Castilla J, Pintado B, Sola I, Sánchez-Morgado JM, Enjuanes L. **Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk.** Nat Biotechnol 1998; 16:349-354.
- Castro FO, Hernández O, Uliver C, Solano R, Milanés C, Aguilar A, Pérez A, de Armas R, Herrera C, de la Fuente J. **Introduction of foreign DNA into the spermatozoa of farm animals.** Theriogenology 1991; 34:1099-1110.
- Catt JW. **Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology.** Anim Reprod Science 1996; 42:239-250.
- Catt JW, Rhodes SL. **Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species.** Reprod Fertil Dev 1995; 7:161-166.
- Celebi C, Guillaudoux T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V, Jegou B. **The making of "transgenic spermatozoa".** Biol Reprod 2003; 68:1477-1483.
- Cerasoli DM, Griffiths EM, Doctor BP, Saxena A, Fedorko JM, Greig NH, Yu QS, Huang Y, Wilgus H, Karatzas CN, Koplovitz I, Lenz DE. **In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger.** Chem Biol Interact 2005; 157-158:363-365.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** Science 1994; 263:802-805.
- Chan AW, Kukolj G, Skalka AM, Bremel RD. **Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection.** Mol Reprod Dev 1999; 52:406-413.
- Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. **Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births.** Mol Hum Reprod 2000a; 6:26-33.

- Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. **Transgen-ICSI reviewed: foreign DNA transmission by intracytoplasmic sperm injection in Rhesus monkey.** *Mol Reprod Dev* 2000b; 56:325-328.
- Chan PJ. **Sperm-mediated DNA transfer to cells of the uterus and embryo.** *Mol Reprod Dev* 2000; 56:316-318.
- Chang K, Qian J, Jiang M, Liu YH, Wu MC, Chen CD, Lai CK, Lo HL, Hsiao CT, Brown L, Bolen J Jr, Huang HI, Ho PY, Shih PY, Yao CW, Lin WJ, Chen CH, Wu FY, Lin YJ, Xu J, Wang K. **Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer.** *BMC Biotechnol* 2002; 2:5.
- Cheng WTK, Moor KM, Polge C. ***In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*.** *Theriogenology* 1986; 25:146.
- Chow SA, Honigberg SM, Bainton RJ, Radding CM. **Patterns of nuclease protection during strand exchange. RecA protein forms heteroduplex DNA by binding to strands of the same polarity.** *J Biol Chem* 1986; 261:6961-6971.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. **Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts.** *Science* 1998b; 280:1256-1258.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. **Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells.** *Nat Biotechnol* 1998a; 16:642-646.
- Clark AJ, Bissinger P, Bullock DW, Damak S, Wallace R, Whitelaw CB, Yull F. **Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression.** *Reprod Fertil Dev* 1994; 6:589-598.
- Clarke AR. **Murine genetic models of human disease.** *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4:453-460.
- Clausen PA, Iyer AP, Zaneveld LJD, Polakosky KL, Waller DP, Drisdell R. **DNA uptake by mammalian spermatozoa.** 16th Annual Meeting An Soc Andrology, *J Androl (Suppl)* 1991; 12.
- Coffin JM. **Genetic variation in avian retroviruses.** *Dev Biol Stand* 1990; 72:123-132.
- Cooper TG. **The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilisation.** Springer-Verlag, Berlin. 1986; 1-281.
- Costantini F, Lacy E. **Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line.** *Nature* 1981; 294:92-94.
- Cox MM. **The bacterial RecA protein as a motor protein.** *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:551-577.
- Cox MM, Lehman IR. **Enzymes of general recombination.** *Annu Rev Biochem* 1987; 56:229-262.
- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Gadea J. **Environment and medium volume influence *in vitro* fertilisation of pig oocytes.** *Zygote* 1993a; 1:209-213.

- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matás C. **Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs.** Theriogenology 1993b; 40:539-546.
- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matás C, Pellicer MT. ***In vitro* fertilization of pig oocytes alter different coincubation intervals.** Theriogenology 1993c; 39:1201-1208.
- Coy P, Romar R. ***In vitro* production of pig embryos: a point of view.** Reprod Fertil Dev 2002; 14:275-286.
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I, Gadea J. **Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems.** Theriogenology 1999; 51:799-812.
- Czaplicki J, Blonska B, Religa Z. **The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human.** J Heart Lung Transplant 1992; 11:393-397.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. **Targeted disruption of the $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene in cloned pigs.** Nat Biotechnol 2002; 20:251-255.
- De la fuente J, Castro FO, Hernandez O, Guillen I, Ullver C, Milanes C, Aguilar A, Cleonart R, Martinez R, Perez A, De Armas R, Herrera L, Limonta J, Cabrera E, Herrera F. **Sperm mediated foreign DNA transfer experiment in different species.** Biotech USA, Ramada Renaissance Tech World, Washington, DC 1990.
- Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D. **Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development.** Biol Reprod 1996; 55:1069-1074.
- Ebert KM, Low MJ, Overstrom EW, Buonomo FC, Baile CA, Roberts TM, Lee A, Mandel G, Goodman RH. **A Moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig.** Mol Endocrinol 1988; 2:277-283.
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K. **Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression.** Biotechnology (N Y) 1991; 9:835-838.
- Ellicot AR, Dziuk PJ and Polge C. **Maintenance of pregnancy in prepubertal gilts.** J Anim Sci 1973; 37:971-973.
- Fainsold A, Frumkin A, Rangini Z, Revel E, Yarus S, Benyehuda A, Gruenbaum Y. **Chicken homeogenes expressed during gastrulation and the generation of transgenic chicken.** In: EMBO-EMBL Symp, Mol Biol Vertebrate Dev 1990; 31.
- Fan J, Watanabe T. **Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models.** Pharmacol Ther 2003; 99:261-282.

- Fantinati P, Zannoni A, Bernardini C, Webster N, Lavitrano M, Forni M, Seren E, Bacci ML. **Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application.** *Theriogenology* 2005; 63:806-817.
- Farre L, Rigau T, Mogas T, García-Rocha M, Canal M, Gómez-Foix AM, Rodríguez-Gil JE. **Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring.** *Mol Reprod Dev* 1999; 53:149-158.
- Fei Y, Hughes TE. **Transgenic expression of the jellyfish green fluorescent protein in the cone photoreceptors of the mouse.** *Vis Neurosci* 2001; 18:615-623.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:7413-7417.
- Francolini M, Lavitrano M, Lamia CL, French D, Frati L, Cotelli F, Spadafora C. **Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells.** *Mol Reprod Dev* 1993; 34:133-139.
- Frank M, Bazer FW, Thatcher WW, Wilcox CJ. **A study of prostaglandin F₂alpha as the luteolysin in swine: III effects of estradiol valerate on prostaglandin F, progesterone, estrone and estradiol concentrations in the utero-ovarian vein of nonpregnant gilts.** *Prostaglandins* 1977; 14:1183-1196.
- Fraser LR. **Na⁺ requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm.** *Int Rev Cytol* 1994; 149:1-46.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. **Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following *in vitro* fertilization.** *Biol Reprod* 1997; 57:49-53.
- Funahashi H, Day BN. **Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes.** *J Reprod Fertil* 1993; 99:97-103.
- Furtado A, Henry R. **Measurement of green fluorescent protein concentration in single cells by image analysis.** *Anal Biochem* 2002; 310:84-92.
- Gagné MB, Pothier F, Sirard MA. **Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes.** *Mol Reprod Dev* 1991; 29:6-15.
- Gagné MB, Pothier F, Sirard MA. **Gene microinjection into bovine pronuclei.** In *Transgenic animals: generation and use*. Ed. LM Houdebine. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, 1997; 7:27-36.
- Gandolfi F. **Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals.** *Transgenic Res* 1998; 7:147-155.
- Gandolfi F, Terqui M, Modina S, Brevini TA, Ajmone-Marsan P, Foulon-Gauze F, Courot M. **Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm.** *Reprod Fertil Dev* 1996; 8:1055-1060.

- García-Roselló E, Matás C, Canovas S, Moreira PN, Gadea J, Coy P. **Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs.** J Androl 2006; 27:268-275.
- Gavin WG. **Gene transfer into goat embryos.** In Transgenic animals: generation and use. Ed. LM Houdebine. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, 1997; 5:19-21.
- Geisert RD, Zavy MT, Moffatt RJ, Blair RM, Yellin T. **Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs.** J Reprod Fertil 1990; 40:293-305.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WM. **Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential.** Theriogenology 2005; 63:445-57.
- Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP, Forsberg CW. **Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure.** Nat Biotechnol 2001; 19:741-745. Erratum in: Nat Biotechnol 2001; 19:979.
- Gordon JW. **Transgenic animals.** Int Rev Cytol 1989; 115:171-229.
- Gordon JW, Ruddle FH. **Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.** Science 1981; 214:1244-1246.
- Goto K, Kinoshita, Takuma, Ogawa K. **Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa.** Vet Rec 1990; 127:517-520.
- Grondahl C, Hansen TH, Hossaini A, Heinze I, Greve T, Hyttel P. **Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro*-matured equine oocytes.** Biol Reprod 1997; 57:1495-1501.
- Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR. **Hormones and growth factors in milk.** Endocrinol Rev 1993; 14:710-728.
- Gruenbaum Y, Revel E, Yarus S, Fainsod A. **Sperm cells as vectors for the generation of transgenic chickens.** J Cell Biochem 1991; 15:194.
- Gutiérrez-Adán A, Behboodi E, Andersen GB, Medrano JF, Murray JD. **Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct.** Theriogenology 1996; 46:515-525.
- Gutiérrez-Adán A, Pintado B. **Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos.** Transgenic Res 2000; 9:81-89.
- Hadjantonakis AK, Cox LL, Tam PP, Nagy A. **An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta.** Genesis 2001; 29:133-140.
- Hadjantonakis AK, Nagy A. **The color of mice: in the light of GFP-variant reporters.** Histochem Cell Biol 2001; 115:49-58.

- Haller O, Arnheiter H, Gresser I, Lindenmann J. **Virus-specific interferon action. Protection of newborn Mx carriers against lethal infection with influenza virus.** J Exp Med 1981; 154:199-203.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. **Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection.** Nature 1985; 315:680-683.
- Hanson P, Mathews V, Marrus SH, Graubert TA. **Enhanced green fluorescent protein targeted to the Sca-1 (Ly-6A) locus in transgenic mice results in efficient marking of hematopoietic stem cells *in vivo*.** Exp Hematol 2003; 31:159-167.
- Hardy JD, Kurrus FD, Chavez CM, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW, Labecki TD. **Heart transplantation in man. developmental studies and report of a case.** JAMA 1964; 188:1132-1140.
- Harrison RAP. **Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility.** J Reprod Fertil 1997; 52:195-211.
- Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. **Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes.** Mol Reprod Dev 1996; 45:378-391.
- Harrison RA, Vickers SE. **Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.** J Reprod Fertil 1990; 88:343-352.
- Hartmann PE, McCauley I, Gooneratne AD, Whitely JL. **Inadequacies of sow lactation: survival of the fittest.** IN: Symp Zool Soc. London 1984; 51:301-326.
- Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JPTM, Kemp B. **Effect of superovulation induction on embryonic development on Day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer.** Theriogenology 2000; 53:1063-1070.
- He W, Ikeda S, Bronson RT, Yan G, Nishina PM, North MA, Naggert JK. **GFP-tagged expression and immunohistochemical studies to determine the subcellular localization of the tubby gene family members.** Brain Res Mol Brain Res 2000; 81:109-117.
- Henikoff S. **Conspiracy of silence among repeated transgenes.** Bioessays 1998; 20:532-535.
- Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T, Hochi S. **Factors affecting production of transgenic rats by ICSI-mediated DNA transfer: effects of sonication and freeze-thawing of spermatozoa, rat strains for sperm and oocyte donors, and different constructs of exogenous DNA.** Mol Reprod Dev 2005; 70:422-428.
- Hirabayashi M, Kato M, Kaneko R, Hirabayashi T, Morita M, Hochi S. **No effect of recombinase-mediated DNA transfer on production efficiency of transgenic rats.** Exp Anim 2006; 55:131-135.
- Hiramoto Y. **Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs.** Exp Cell Res 1962; 27:416-426.

- Hochi S, Minomiya T, Mizuno A, Homma M, Yuchi A. **Fate of exogenous DNA carried into mouse eggs by spermatozoa.** Anim Biotechnol 1990; 1:25-30.
- Hoelker M, Mekchay S, Schneider H, Brackett BG, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Gilles M, Rings F, Griese J, Schellander K. **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 2007; 67:1067-1107.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. **Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes.** Biol Reprod 2004; 71:405-409.
- Horan R, Powell R, McQuaid S, Gannon F, Houghton JA. **Association of foreign DNA with porcine spermatozoa.** Arch Androl 1991; 26:83-92.
- Horan R, Powell R, Bird JM, Gannon F, Houghton JA. **Effects of electropermeabilization on the association of foreign DNA with pig sperm.** Arch Androl 1992a; 28:105-114.
- Horan R, Powell R, Gannon F, Houghton JA. **The fate of foreign DNA associated with pig sperm following the *in vitro* fertilization of zona-free hamster ova and zona-intact pig ova.** Arch Androl 1992b; 29:199-206.
- Hosoi Y, Iritani A. **Rabbit microfertilization.** Mol Reprod Dev 1993; 36:282-284.
- Houdebine LM. **Animal transgenesis: recent data and perspectives.** Biochimie 2002; 84:1137-1141.
- Houdebine LM. **Preparation of recombinant proteins in milk.** Methods Mol Biol 2004; 267:485-494.
- Houdebine LM. **Transgenic animal bioreactors.** Transgenic Res 2000; 9:305-320.
- Houdebine LM. **Use of transgenic animals to improve human health and animal production.** Reprod Domest Anim 2005; 40:269-281.
- Houdebine LM, Weill B. **The impact of transgenesis and cloning on cell and organ xenotransplantation to humans.** In Novel frontiers in the production of compounds for biomedical use. Eds A Van Broekhoven, F Shapiro, J Anné. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999; 351-362.
- Huguet E, Esponda P. **Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa.** Mol Reprod Dev 1998; 51:42-52.
- Huguet E, Esponda P. **Generation of genetically modified mice by spermatozoa transfection *in vivo*: preliminary results.** Mol Reprod Dev 2000; 56:243-247.
- Hunter RH. **Oviducts function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy.** Mol Reprod Dev 1991; 29:385-391.
- Hunter RH. **Polispermy.** In Encyclopedia of Reproduction. Eds E Knobil and JD Neill. Academic Press, San Diego, USA 1999; 3:930-937.

- Husberg BS, Starzl TE. **Proceedings: The outcome of kidney retransplantation.** Arch Surg 1974; 108:584-587.
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y, Okabe M. **A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP).** FEBS Lett 1995; 375:125-128.
- Inoue K, Yamashita S, Hata J, Kabeno S, Asada S, Nagahisa E, Fujita T. **Electroporation as a new technique for producing transgenic fish.** Cell Differ Dev 1990; 29:123-128.
- Iritani A, Hosoi Y, Torii R. **Application of ICSI in domestic and/or zoo animals.** Gamet Dev Function, Serono Symposia 1998; 393-404.
- Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M. **Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology.** Exp Nephrol 2001; 9:444-450.
- Izzo AD, Mackanos MA, Beckham JT, Jansen ED. **In vivo optical imaging of expression of vascular endothelial growth factor following laser incision in skin.** Lasers Surg Med 2001; 29:343-350.
- Jonak J. **Sperm-mediated preparation of transgenic *Xenopus laevis* and transmission of transgenic DNA to the next generation.** Mol Reprod Dev 2000; 56:298-300.
- Jost B, Vilotte JL, Duluc I, Rodeau JL, Freund JN. **Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland.** Nat Biotechnol 1999; 17:160-164.
- Kane MT. **A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology.** Anim Reprod Sci 2003; 79:171-190.
- Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. **Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection.** Theriogenology 2005; 64:1704-1715. Erratum in: Theriogenology 2006; 66:494.
- Katayama M, Rieke A, Cantley T, Murphy C, Dowell L, Sutovsky P, Day BN. **Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture in a cysteine-supplemented medium.** Theriogenology 2007; 67:835-847.
- Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T, Hochi S, Hirabayashi M. **Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study.** Mol Reprod Dev 2004; 69:153-158.
- Kato M, Yamanouchi K, Ikawa M, Okabe M, Naito K, Tojo H. **Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene.** Mol Reprod Dev 1999; 54:43-48.
- Kato Y, Tani Y, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. **Eight calves cloned from somatic cells of a single adult.** Science 1998; 182:2095-2098.

- Kawakami N, Nishizawa F, Sakane N, Iwao M, Tsujikawa K, Ikawa M, Okabe M, Yamamoto H. **Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus.** J Immunol 1999a; 163:3211-3216.
- Kawakami N, Sakane N, Nishizawa F, Iwao M, Fukada SI, Tsujikawa K, Kohama Y, Ikawa M, Okabe M, Yamamoto H. **Green fluorescent protein-transgenic mice: immune functions and their application to studies of lymphocyte development.** Immunol Lett 1999b; 70:165-171.
- Keefer CL. **Production of bioproducts through the use of transgenic animal models.** Anim Reprod Sci 2004; 82-83:5-12.
- Kemp CJ. **The use of mouse knockouts to study tumor suppressor genes.** In Transgenic animals: generation and use. Ed LM Houdebine. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, 1997; 60:411-419.
- Khoo HW, Ang LH, Lim HB, Wong KY. **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish.** Aquaculture 1992; 107:1-19.
- Kiessling AA, Markoulaki S. **Interaction of gametes with exogenous genes: possible opportunities for incorporation into embryonic genome.** Mol Reprod Dev 2000; 56:271-274.
- Kimura Y, Yanagimachi R. **Intracytoplasmic sperm injection in the mouse.** Biol Reprod 1995; 52:709-720.
- King GJ, Macpherson JW. **Fertility of beef cows treated during estrus with human chorionic gonadotrophin.** Can Vet J 1973; 14:221-222.
- Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, Fitzpatrick-McElligott S. **Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment.** Biotechnology (N Y) 1992; 10:286-291.
- Klein TM, Fitzpatrick-McElligott S. **Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues.** Curr Opin Biotechnol 1993; 4:583-590.
- Klocke S. **ICSI of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes with epididymal spermatozoa and boar spermatozoa flowcytometrically sorted for gender.** Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover 1999.
- Kowalczykowski SC, Eggleston AK. **Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins.** Annu Rev Biochem 1994; 63:991-1043.
- Kolbe T, Holtz W. **Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI).** Anim Reprod Science 2000; 64:97-101.
- Kolbe T, Holtz W. **Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig.** Theriogenology 1999; 52:671-682.
- Koles K, van Berkel PH, Mannesse ML, Zoetemelk R, Vliegthart JF, Kamerling JP. **Influence of lactation parameters on the N-glycosylation of recombinant human C1 inhibitor isolated from the milk of transgenic rabbits.** Glycobiology 2004; 14:979-986.

- Kroll KL, Amaya E. **Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation.** *Development* 1996; 122:3173-3183.
- Krueger C, Rath D. **Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number.** *Reprod Fertil Dev* 2000; 12:113-117.
- Krueger C, Rath D, Johnson LA. **Low dose insemination in synchronized gilts.** *Theriogenology* 1999; 52:1363-1373.
- Kues WA, Niemann H. **The contribution of farm animals to human health.** *Trends Biotechnol* 2004; 22:286-294.
- Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, Tomizuka K, Ishida I, Robl JM. **Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle.** *Nat Genet* 2004; 36:775-780.
- Kurome M, Ueda H, Tomii R, Naruse K, Nagashima H. **Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer.** *Transgenic Res* 2006; 15:229-240.
- Kurome M, Wako N, Ochiai T, Arai Y, Kurihara T, Miyazaki K, Fujimura T, Takahagi Y, Murakami H and Nagashima H. **Expression of GFP gene introduced into porcine *in vitro* matured oocytes by intracytoplasmic sperm injection.** *Transgenic animal research conference III, Tahoe City, California, UC Davis Biotechnology Program* 2001.
- Kusser KL, Randall TD. **Simultaneous detection of EGFP and cell surface markers by fluorescence microscopy in lymphoid tissues.** *J Histochem Cytochem* 2003; 51:5-14.
- Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. **Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience.** *Nat Med* 2005; 11:29-31.
- Kuznetsov AV, Kuznetsova IV. **Binding of exogenous DNA pRK3lacZ by the rabbit spermatozoa, its transfer in the oocytes, and expression in the preimplantation embryos.** *Russian J Dev Biol* 1995; 26:300-309.
- Lacham-Kaplan O, Trounson A. **Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction.** *Hum Reprod* 1995; 10:2642-2649.
- Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Kuhholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN, Prather RS. **Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes.** *Zygote* 2001; 9:339-346.
- Langlais J, Roberts KD. **A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa.** *Gamete Res* 1985; 12:183-224.

- Lavitrano M, Lulli V, Maione B, Sperandio S, Spadafora C. **Sperm-Mediated Gene Transfer**. In *Microinjection and transgenesis, strategies and protocols. A laboratory manual*. Eds A Cid-Arregui and A. García-Carrancá. Springer Verlag, Berlin 1996; 229-254.
- Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfe G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. **Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14230-14235.
- Lavitrano M, Maione E, Forte E, Francolini M, Sperandio S, Testi R, Spadafora C. **The interaction of sperm cells with exogenous DNA: A role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules**. *Exp Cell Res* 1997b; 233:56-62.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice**. *Cell* 1989; 57:717-723.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. **Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake**. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:284-291.
- 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. **Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation**. *Transplant Proc* 1997a; 29:3508-3509.
- Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. **The interaction between exogenous DNA and sperm cells**. *Mol Reprod Dev* 1992; 31:161-169.
- Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. **Uptake of Exogenous DNA by Mammalian Spermatozoa. Interaction Between Sperm Cells and Foreign DNA**. In *Biotechnology of cell regulation (Vol. 4)*. Eds R Verna and Y Nishizuka. Raven Press, New York. 1991: 315-322.
- Lavitrano M, Stoppacciaro A, Bacci ML, Forni M, Fioretti D, Pucci L, Di Stefano C, Lazzereschi D, Rughetti A, Ceretta S, Zannoni A, Rahimi H, Moioli B, Rossi M, Nuti M, Rossi G, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. **Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer**. *Transplant Proc* 1999; 31:972-974.
- Lazzereschi D, Forni M, Cappello F, Bacci ML, Di Stefano C, Marfe G, Giancotti P, Renzi L, Wang HJ, Rossi M, Della Casa G, Pretagostini R, Frati G, Bruzzzone P, Stassi G, Stoppacciaro A, Turchi V, Cortesini R, Sinibaldi P, Frati L, Lavitrano M. **Efficiency of transgenesis using sperm-mediated gene transfer: generation of hDAF transgenic pigs**. *Transplant Proc* 2000; 32:892-894.
- Lee JW, Dinnyes A, Yang X. **Development of transgenic embryos following injection of freeze-fried sperm in pigs**. *Theriogenology*. 2003; 59:305.

- Li L, Shen W, Min L, Dong H, Sun Y, Pan Q. **Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer.** *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:689-695.
- Li Y, Behnam J, Simkiss K. **Ballistic transfection of avian primordial germ cell in ovo.** *Transgenic Res* 1995; 4:26-29.
- Lindsay M, Gil GC, Cadiz A, Velander WH, Zhang C, Van Cott KE. **Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations.** *J Chromatogr A* 2004; 1026:149-157.
- Llombart C. **Análisis de los vasos sanguíneos de la retina en ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP).** Tesina de licenciatura 2003. Universidad Autónoma. Barcelona.
- Lubon H. **Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins.** *Biotechnol Annu Rev* 1998; 4:1-54.
- Maga EA. **The use of recombinase proteins to generate transgenic large animals.** *Cloning Stem Cells* 2001; 3:233-241.
- Maga EA, Sargent RG, Zeng H, Pati S, Zarling DA, Oppenheim SM, Collette NM, Moyer AL, Conrad-Brink JS, Rowe JD, BonDurant RH, Anderson GB, Murray JD. **Increased efficiency of transgenic livestock production.** *Transgenic Res* 2003; 12:485-496.
- Magnano AR, Giordano R, Moscufo N, Baccetti B, Spadafora C. **Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome.** *J Reprod Immunol* 1998; 41:187-196.
- Maione B, Lavitrano ML, Spadafora C, Kiessling A. **Sperm-Mediated Gene Transfer in Mice.** *Mol Reprod Dev* 1998; 50:406-409.
- Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. **Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA.** *DNA Cell Biol* 1997; 16:1087-1097.
- Makowka L, Wu GD, Hoffman A, Podesta L, Sher L, Tusó PJ, Breda M, Chapman FA, Cosenza C, Yasunaga C, Cramer DV. **Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft.** *Transplant Proc* 1994; 26:1074-1075.
- Martin MJ. **Development of *in vivo* matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection.** *Biol Reprod* 2000; 63:109-112.
- Martin MJ, Pinkert CA. **Production of transgenic swine.** In *Transgenic animals technology: a laboratory handbook*. Ed CA Pinkert. Academic Press, Alabama 1994; 11:315-337.
- Martínez B. **Estudio de fecundación *in vitro* en porcino: reducción de la polispermia y optimización de la producción *in vitro* de embriones.** Tesis Doctoral 2002; Universidad Complutense. Madrid.

- Martínez EA, Caamaño JN, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vázquez JM, Roca J, Vázquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS, Day BN. **Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs.** Theriogenology 2004; 61:137-146.
- Martínez EA, Vázquez JM, Matás C, Roca J, Coy P, Gadea J. **Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage.** Theriogenology 1993; 40:547-557.
- Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. **Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows.** Reproduction 2002; 123:163-170.
- Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. **Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows.** Reproduction 2001; 122:289-296.
- Matás C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J, Ruiz S. **Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs.** Reproduction 2003; 125:133-141.
- Mattioli M, Galeati G, Bacci ML, Seren E. **Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte.** Gamete Res 1988; 21:223-232.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. **Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture.** Cell 1992; 70:841-847.
- McCarthy S, Ward WS. **Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa.** Mol Reprod Dev 2000; 56:235-237.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. **Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells.** Nature 2000; 405:1066-1069. Erratum in: Nature 2000; 408:120.
- McLay DW, Clarke HJ. **Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals.** Reproduction 2003; 125:625-633.
- Meade H. **AT III from goats through clinical trials.** Transgenic Animal Research Conference IV, Tahoe City, CA, USA Davis Biotechnology Program 1999; 33.
- Meizel S. **The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction.** Biol Rev Camb Philos Soc 1984; 59:125-157.
- Meng F, Whittaker CA, Ransom DG, DeSimone DW. **Cloning and characterization of cDNAs encoding the integrin alpha2 and alpha3 subunits from *Xenopus laevis*.** Mech Dev 1997; 67:141-155.
- Miller HI. **As biotech turns 20...** Nat Rev Drug Discov 2002; 1:1007-1008.
- Milne CP, Elschen FA, Collis JE, Jensen TL. **Preliminary evidence for honeybee sperm mediated DNA transfer.** Int Symp Molecular Insect Science 1989; 120-125.

- Mitra A, Hruska KS, Wellnitz O, Kerr DE, Capuco AV, Wall RJ. **Expression of lysostaphin in milk of transgenic mice affects the growth of neonates.** *Transgenic Res* 2003; 12:597-605.
- Moisyadi S, Kaminski JM, Yanagimachi R. **Use of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) to generate transgenic animals.** *Comparative Immunology, BMC Infect Dis* 2007. In press.
- Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jimenez A, Montoliu L, Gutierrez-Adan A. **Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection.** *Biol Reprod* 2004; 71:1943-1947.
- Moreira PN, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Pozueta J, Montoliu L, Gutierrez-Adán A. **Effect of Transgene Concentration, Flanking Matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse Transgenesis Mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection.** *Biol Reprod* 2007; 76:336-343.
- Mori T, Wu GM, Mori E, Shindo Y, Mori N, Fukuda A, Mori T. **Expression of class II major histocompatibility complex antigen on mouse sperm and its roles in fertilization.** *Am J Reprod Immunol* 1990; 24:9-14.
- Mueller F, Ivics Z, Erdelyi F, Papp T, Varadi L, Horvath L, Maclean N, Orban L. **Introduction of foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier.** *Mol Mar Biol Biotechnol* 1992; 1:276-281.
- Muir WM. **The threats and benefits of GM fish.** *EMBO Rep* 2004; 5:654-659.
- Müller M, Brenig B, Winnacker EL, Brem G. **Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection.** *Gene* 1992; 121:263-270.
- Müller M, Weidle UH, Brem G. **Antibody encoding transgenes - their potential use in congenital and intracellular immunisation of farm animals.** In *Transgenic Animals: generation and use.* Ed LM Houdebine. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1997; 73:495-499.
- Muramatsu T, Mizutani Y, Ohmori Y, Okumura J. **Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997a; 230:376-380.
- Muramatsu T, Nakamura A, Park HM. ***In vivo* electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals.** *Int J Mol Med* 1998; 1:55-62.
- Muramatsu T, Shibata O, Ryoki S, Ohmori Y, Okumura J. **Foreign gene expression in the mouse testis by localized *in vivo* gene transfer.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997b; 233:45-49.
- Murray J, Reh W, Anderson G, Maga E. **Changing the composition of milk to improve human health.** *Transgenic Animal Research Conference IV, Tahoe City, CA, USA.* UC Davis Biotechnology Program 2003; 32.

- Myles DG, Primakoff P. **Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg.** Biol Reprod 1997; 56:320-327.
- Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Esaki R, Kano K, Saito S, Okabe M, Murakami H. **Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs.** Theriogenology 2003; 59:95-106.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. **Viable piglets generated from porcine oocytes matured *in vitro* and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection.** Biol Reprod 2003; 68:1003-1008. Erratum in: Biol Reprod 2003; 68:1941.
- Nakanishi A, Iritani A. **Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods.** Mol Reprod Dev 1993; 36:258-261.
- Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Toshimori K, Okabe M. **Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation.** Dev Biol 2001; 237:222-231.
- Nakanishi T, Kuroiwa A, Yamada S, Isotani A, Yamashita A, Tairaka A, Hayashi T, Takagi T, Ikawa M, Matsuda Y, Okabe M. **FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome.** Genomics 2002; 80:564-574.
- Naruse K, Ishikawa H, Kawano HO, Ueda H, Kurome M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M. **Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein.** J Reprod Dev 2005; 51:539-546.
- Niemann H, Kues WA. **Transgenic livestock: premises and promises.** Anim Reprod Sci 2000; 60-61:277-293.
- Niemann H, Rath D, Wrenzycki C. **Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine.** Reprod Dom Anim 2003; 38:82-89.
- Niemann H, Kues WA. **Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine.** Anim Reprod Sci 2003; 79:291-317.
- Nikolov ZL, Woodard SL. **Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock.** Curr Opin Biotechnol 2004; 15:479-486.
- Noble MS, Rodriguez-Zas S, Cook JB, Bleck GT, Hurley WL, Wheeler MB. **Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine alpha-lactalbumin in their milk.** J Anim Sci 2002; 80:1090-1096.
- Notarianni E, Galli C, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. **Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep.** J Reprod Fertil (Suppl) 1991; 43:255-260.

- Nottle MB, Haskard KA, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Harrison SJ, Barlow H, Wigley PL, Lyons IG, Cowan PJ, Crawford RJ, Tolstoshev PL, Pearse MJ, Robins AJ, d'Apice AJ. **Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs.** *Transgenic Res* 2001; 10:523-531.
- O'Donnell JK, Birch P, Parsons CT, White SP, Okabe J, Martin MJ, Adams C, Sundarapandiyam K, Manjula BN, Acharva AS, Logan JS, Kumar R. **Influence of the Chemical Nature of Side Chain at P105 of Hemoglobin A on the Modulation of the Oxygen Affinity by Chloride Ions.** *J Biol Chem* 1994; 44 :27692-27699.
- Ohta H, Yomogida K, Yamada S, Okabe M, Nishimune Y. **Real-time observation of transplanted 'green germ cells': proliferation and differentiation of stem cells.** *Dev Growth Differ* 2000; 42:105-112.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. **'Green mice' as a source of ubiquitous green cells.** *FEBS Lett* 1997; 407:313-319.
- Oliveira SC, Harms JS, Rosinha GM, Rodarte RS, Rech EL, Splitter GA. **Biolistic-mediated gene transfer using the bovine herpesvirus-1 glycoprotein D is an effective delivery system to induce neutralizing antibodies in its natural host.** *J Immunol Methods* 2000; 245:109-118.
- Ono E, Amagai K, Taharaguchi S, Tomioka Y, Yoshino S, Watanabe Y, Cherel P, Houdebine LM, Adam M, Eloit M, Inobe M, Uede T. **Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies-resistant livestock.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:16150-16155.
- Ono K, Takii T, Onozaki K, Ikawa M, Okabe M, Sawada M. **Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262:610-614.
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. **Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.** *Science* 1996; 273:1392-1395.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. ***In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium.** *Theriogenology* 1999; 51:461-472.
- Paszty C, Mohandas N, Stevens ME, Loring JF, Liebhaber SA, Brion CM, Rubin EM. **Lethal alpha-thalassaemia created by gene targeting in mice and its genetic rescue.** *Nat Genet* 1995; 11:33-39.
- Patil JG, Khoo HW. **Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation.** *J Exp Zool* 1996; 274:121-129.
- Patil JG, Khoo HW. **Ultrastructural *in situ* hybridization and autoradiographic detection of foreign DNA in zebrafish spermatozoa.** *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35:965-969.
- Pavlou AK, Reichert JM. **Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010.** *Nat Biotechnol* 2004; 22:1513-1519.

- Pérez A, Soana R, Castro FO, Leonart RL, de Armas R, Martínez R, Aguilar A, Herrera L, De la Fuente J. **Sperm cells mediated gene transfer in cattle.** *Biotechnol Aplicada* 1991; 8:95-101.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. **Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection.** *Science* 1999; 284:1180-1183.
- Peters KG, Rao PS, Bell BS, Kindman LA. **Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live zebrafish embryos.** *Dev Biol* 1995; 171:252-257.
- Petters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, Rojas G, Hao Y, Flowers WL, Banin E, Cideciyan AV, Jacobson SG, Wong F. **Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa.** *Nat Biotechnol* 1997; 15:947-948.
- Petters RM, Shuman RM, Johnson BH, Mettus RV. **Gene transfer in swine embryos by injection of cells infected with retrovirus vectors.** *J Exp Zool* 1987; 242:85-88.
- Petters RM, Sommer JR. **Transgenic animals as models for human disease.** *Transgenic Res* 2000; 9:347-351.
- Petters RM, Wells KD. **Culture of pig embryos.** *J Reprod Fert Suppl* 1993; 48:61-73.
- Pezen DS, Leonard JM, Abramczuk JW, Martin MA. **Transgenic mice carrying HIV proviral DNA.** *Biotechnol* 1991; 16:213-226.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. **Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs.** *Science* 2003; 299:411-414.
- Piedrahita JA, Moore K, Oetama B, Lee CK, Scales N, Ramsoondar J, Bazer FW, Ott T. **Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies.** *Biol Reprod* 1998; 58:1321-1329.
- Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degrassi F, Giordano R, Magnano AR, Lorenzini R, Lavia P, Spadafora C. **A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA.** *J Cell Sci* 1999; 112:3537-3548.
- Polejaeva IA, Campbell KH. **New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis.** *Theriogenology* 2000; 53:117-126.
- Polge C. **Fertilization in the pig and horse.** *J Reprod Fertil* 1978; 54:461-470.
- Polge C, Salamon S, Wilmut I. **Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination.** *Vet Rec* 1970; 87:424-429.

- Polge EJC, Barton SC, Surani MHA, Miller JR, Wagner T, Elsome K, Davis AJ, Goode JA, Foxroft GR, Heap RB. **Induced expression of a bovine growth hormone construct in transgenic pigs.** In *Biotechnology of growth regulation*. Eds RB Heap, CG Prosser, GE Lamming. Butterworths, London 1989; 189-199.
- Pope CE, Johnson CA, Mcrae MA, Keller GI, Dresser BI. **Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes.** *Anim Reprod Sci* 1998; 53:221-236.
- Prasher DC. **Using GFP to see the light.** *Trends Genet* 1995; 11:320-323.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cornier MJ. **Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.** *Gene* 1992; 111:229-233.
- Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL. **Transgenic swine for biomedicine and agriculture.** *Theriogenology* 2003; 59:115-123.
- Pricentau M. **Grefte renale.** *J Med Bordeaux* 1905; 26:549.
- Probst S, Rath D. **Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes.** *Theriogenology* 2003; 59:961-973.
- Puchalski RB, Fahl WE. **Gene transfer by electroporation, lipofection, and DEAE-dextran transfection: compatibility with cell-sorting by flow cytometry.** *Cytometry* 1992; 13:23-30.
- Pursel VG. **Techniques and problems in producing transgenic pigs.** In *Transgenic Animals: generation and use*. Ed LM Houdebine. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1997; 4:15-17.
- Pursel VG, Hammer RE, Bolt DJ, Palmiter RD, Brinster RL. **Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs.** *J Reprod Fertil* 1990; 41:77-87.
- Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. **Genetic engineering of livestock.** *Science* 1989; 244:1281-1288.
- Pursel VG, Rexroad CE Jr. **Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep.** *Mol Reprod Dev* 1993a; 36:251-254.
- Pursel VG, Rexroad CE Jr. **Status of research with transgenic farm animals.** *J Anim Sci* 1993b; 71; 3:10-19.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. **In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer.** *J Anim Sci* 1999; 77:3346-3352.
- Rath D, Niemann H. **In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars.** *Theriogenology* 1997; 47:785-793.

- Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce CW, Dewitt CW, Smith PE, Hewitt RL, Flinner RL, Creech O Jr. **Renal heterotransplantation in man.** *Ann Surg* 1964; 160:384-410.
- Reiss M, Jastreboff MM, Bertino JR, Narayanan R. **DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137:244-249.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. **Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture.** *Nature* 1992; 359:550-551.
- Rexroad CE Jr, Hammer RE, Bolt DJ, Mayo KE, Frohman LA, Palmiter RD, Brinster RL. **Production of transgenic sheep with growth-regulating genes.** *Mol Reprod Dev* 1989; 1:164-169.
- Rexroad CE Jr, Mayo K, Bolt DJ, Elsasser TH, Miller KF, Behringer RR, Palmiter RD, Brinster RL. **Transferrin- and albumin-directed expression of growth-related peptides in transgenic sheep.** *J Anim Sci* 1991; 69:2995-3004.
- Rieth A, Pothier F, Sirard MA. **Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events.** *Mol Reprod Dev* 2000; 57:338-345.
- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. **Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector.** *Nature* 1986; 323:445-448.
- Robinson KO, Ferguson HJ, Cobey S, Vaessin H, Smith BH. **Sperm-mediated transformation of the honey bee, *Apis mellifera*.** *Insect Mol Biol* 2000; 9:625-634.
- Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. **Transgenic animal production and animal biotechnology.** *Theriogenology* 2007; 67:127-133.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA. **Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa.** *Theriogenology* 2003; 60:77-87.
- Rodríguez-Martínez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S, Larsson K. **Ultrastructure of the utero-tubal junction in the preovulatory pigs.** *Anat Histol Embryol* 1990; 19:16-36.
- Romoser VA, Hinkle PM, Persechini A. **Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators.** *J Biol Chem* 1997; 272:13270-13274.
- Rottmann OJ, Antes R, Hofer P, Maierhof G. **Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells.** *J Anim Breed Genet* 1992; 109:64-70.
- Rottmann O, Antes R, Hofer P, Sommer B, Wanner G, Gorchach A, Grummt F, Pirchner F. **Liposome-mediated gene transfer via sperm cells. High transfer efficiency and persistence of transgenes by use of liposomes and sperm cells and a murine amplification element.** *J Anim Breed Genet* 1996; 113: 401-411.

- Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, Suzuki I, Tasaka Y, Kano K, Taguchi Y, Mikami K, Hirabayashi M, Kashiwazaki N, Hosoi Y, Murata N, Iritani A. **Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs.** Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:6361-6366.
- Sanford JC, Devit MJ, Russell JA, Smith FD, Harpening PR, Roy Mk, Jonhston SA. **An improved helium-driven biolistic device.** Technique 1991; 3:3-16.
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA. **Optimizing the biolistic process for different biological applications.** Methods Enzymol 1993; 217:483-509.
- Sarangi N, Mandall AB, Bandyopadhyay AK, Venugopal T, Mathavan S, Pandian TJ. **Electroporated sperm mediated gene transfer in Indian major carps.** Asi Pac J Mol Biol Biotechnol 1999; 7:151-158.
- Sato H, Hattori S, Kawamoto S, Kudoh I, Hayashi A, Yamamoto I, Yoshinari M, Minami M, Kanno H. **In vivo gene gun-mediated DNA delivery into rodent brain tissue.** Biochem Biophys Res Commun 2000; 270:163-170.
- Sato M, Gotoh K, Kimura M. **Sperm-mediated gene transfer by direct injection of foreing DNA into mouse testis.** Transgenics 1999a; 2:357-369.
- Sato M, Ishikawa A, Kimura M. **Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa.** Mol Reprod Dev 2002; 61:49-56.
- Sato M, Yabuki K, Watanabe T, Kimura M. **Testis mediated gene transfer (TMGT) in mice: successful transmisi3n of introduced DNA from FO to F2 generations.** Transgenics 1999b; 3:11.
- Schellander K, Peli J, Schomoll F, Brem G. **Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm.** Anim Biothechnol 1995; 6:41-50.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. **Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts.** Science 1997; 278:2130-2133.
- Sciamanna I, Piccoli S, Barberi L, Zaccagnini G, Magnano AR, Giordano R, Campedelli P, Hodgson C, Lorenzini R, Spadafora C. **DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer.** Mol Reprod Dev 2000; 56:301-305.
- Seamark R. **Potential of transgenic pigs and related technology for the pig industry.** In Manipulating pig production. Eds JL Barnett, ES Batterham, GM Cronin, C Hansen, PH Hemsworth, DP Hennessy, PE Hughes, NE Johnston, RH King. VIP Printing Pty Ltd, Australia 1987; 165-170.
- Selles E, Gadea J, Romar R, Mat3s C, Ruiz S. **Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility.** Reprod Dom Anim 2003; 38:66-72.

- Seo BB, Kim CH, Yamanouchi K, Takahashi M, Sawasaki T, Tachi C, Tojo H. **Co-injection of restriction enzyme with foreign DNA into the pronucleus for elevating production efficiencies of transgenic animals.** Anim Reprod Sci 2000; 63:113-122.
- Shalgi R, Phillips DM. **Mechanism of sperm entry in cycling hamsters.** J Ultrastruct Res 1980; 71:154-161.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. **Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.** Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:13726-13731. Erratum in: Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:1162.
- Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y. **Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring.** Mol Reprod Dev 2000; 56:306-308.
- Shen W, Li L, Pan Q, Min L, Dong H, Deng J. **Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method.** Mol Reprod Dev 2006; 73:589-594.
- Shim H, Gutierrez-Adán A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. **Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells.** Biol Reprod 1997; 57:1089-1095.
- Shim SW, Kim YH, Jun SH, Lim JM, Chung HM. **Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection.** Theriogenology 2000; 53:521.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*.** J Cell Comp Physiol 1962; 59:223-239.
- Shinohara A, Ogawa T. **Homologous recombination and the roles of double-strand breaks.** Trends Biochem Sci 1995; 20:387-391.
- Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S. **Active integration: new strategies for transgenesis.** Transgenic Res 2007; 16:333-339.
- Sidhu KS, Guraya SS. **Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa.** Int Rev Cytol 1989; 118:231-280.
- Sin FYT, Bartley AL, Walker SP, Sin IL, Symonds JE, Hawke L, Hopkins CL. **Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA.** Aquaculture 1993; 117:57-69.
- Sin FYT, Walker SP, Symonds JE, Mukherjee UK, Khoo JG, Sin IL. **Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability, and fate of transgene.** Mol Reprod Dev 2000; 56:285-288.

- Smith K, Spadafora C. **Sperm-mediated gene transfer: applications and implications.** *Bioessays* 2005; 27:551-562.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
- Smolenski RT, Forni M, Maccherini M, Bacci ML, Slominska EM, Wang H, Fornasari P, Giovannoni R, Simeone F, Zannoni A, Frati G, Suzuki K, Yacoub MH, Lavitrano M. **Reduction of hyperacute rejection and protection of metabolism and function in hearts of human decay accelerating factor (hDAF)-expressing pigs.** *Cardiovasc Res* 2007; 73:143-152.
- Soler E, Le Saux A, Cohen R, Merle C, Guinet F, Passet B, Sorel V, Martin K, Perrin A, Piriou A, Charpilienne A, Fourgoux C, Schartz-Cornil I, Cohen J, Houdebine LM. **Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in milk of transgenic rabbits.** In: *Vaccination against enteric diseases, Congress book, Montego Bay, Jamaica* 2004.
- Sowa S, Graham JK, Barisas BG. **Binding of protein-targeted liposomes to mammalian spermatozoa.** *FASEB J* 1995; 9:A80.
- Spadafora C. **Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation.** *Bioessays* 1998; 20:955-964.
- Spadafora C, Geraci G. **The subunit structure of sea urchin sperm chromatin: a kinetic approach.** *FEBS Lett* 1975; 57:79-82.
- Sperandio S, Lulli V, Bacci ML, Forni M, Maione B, Spadafora C, Lavitrano M. **Sperm mediated gene transfer in bovine and swine species.** *Anim Biotech* 1996; 7:59-77.
- Spinaci M, Seren E, Mattioli M. **Maternal chromatin remodeling during maturation and after fertilization in mouse oocytes.** *Mol Reprod Dev* 2004; 69:215-221.
- Squires EJ, Drake D. **Liposome-mediated DNA transfer to chicken sperm cells.** *Anim Biotech* 1993; 4:71-88.
- Staeheli P, Haller O, Boll W, Lindenmann J, Weissmann C. **Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus.** *Cell* 1986; 44:147-158.
- Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Zeevi A, Ramos H, Terasaki P, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad S, Murase N. **Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation.** *Transplantation* 1993; 55:1272-1277.
- Starzl TE, Marchioro TL, Peters GN, Kirkpatrick CH, Wilson WE, Porter KA, Rifkind D, Ogden DA, Hitchcock CR, Waddell WR. **Renal heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases.** *Transplantation* 1964; 2:752-776.
- Stein KK, Primakoff P, Myles D. **Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane.** *J Cell Sci* 2004; 117:6269-6274.

- Stewart CN Jr. **Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms.** Trends Biotechnol 2006; 24:155-162.
- Storb U. **Transgenic mice with immunoglobulin genes.** Annu Rev Immunol 1987; 5:151-174.
- Stowers AW, Chen Lh LH, Zhang Y, Kennedy MC, Zou L, Lambert L, Rice TJ, Kaslow DC, Saul A, Long CA, Meade H, Miller LH. **A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects Aotus monkeys from a lethal challenge with Plasmodium falciparum.** Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:339-344.
- Suárez S, Redfern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM. **Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviductal *in vitro*: possible role in formation of a sperm reservoir.** Biol Reprod 1991; 44:998-1004.
- Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R, Moisyadi S. **Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis.** Biol Reprod 2005; 73:1157-1163.
- Sun QY, Nagai T. **Molecular mechanism underlying pig oocyte maturation and fertilization.** J Reprod Dev 2003; 49:347-359.
- Sutrave P, Kelly AM, Hughes SH. **Ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice.** Genes Dev 1990; 4:1462-1472.
- Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell JK, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S, Logan JS. **Production of functional human hemoglobin in transgenic swine.** Biotechnology (N Y) 1992; 10:557-559.
- Switzer WM, Michler RE, Shanmugam V, Matthews A, Hussain AI, Wright A, Sandstrom P, Chapman LE, Weber C, Safley S, Denny RR, Navarro A, Evans V, Norin AJ, Kwiatkowski P, Heneine W. **Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs.** Transplantation 2001; 71:959-965.
- Symonds JE, Walker SP, Sin FYT. **Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA-evidence of enhanced sperm DNA association.** Aquaculture 1994a; 119:313-327.
- Symonds JE, Walker SP, Sin FYT, Sin I. **Development of a mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm.** Mol Mar Biol Biotechnol 1994b; 3:104-111.
- Szczygiel MA, Moisyadi S, Ward WS. **Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse.** Biol Reprod 2003; 68:1903-1910.
- Takada T, Iida K, Awaji T, Itoh K, Takahahi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S, Tsujimoto G. **Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker.** Nat Biotechnol 1997; 15:458-461.
- Töpfer-Petersen E, Petrounina AM, Ekhlasi-Hundrieser M. **Oocyte-sperm interactions.** Anim Reprod Sci 2000; 60-61:653-662.

- Tsai HJ, Lai CH, Yang HS. **Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor supertexta*).** *Transgenic Res* 1997; 6:85-95.
- Tsien RY. **The green fluorescent protein.** *Annu Rev Biochem* 1998; 67:509-544.
- Tur-Kaspa R, Teicher L, Levine BJ, Skoultchi AI, Shafritz DA. **Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes.** *Mol Cell Biol* 1986; 6:716-718.
- Tyrer NM, Shepherd D, Williams DW. **Methods for imaging labeled neurons together with neuropil features in *Drosophila*.** *J Histochem Cytochem* 2000; 48:1575-1582.
- Uehara T, Yanahimachi R. **Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei.** *Biol Reprod* 1976; 15: 467-470.
- Vadnais ML, Roberts KP. **Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm.** *J Androl* 2006; 28:416-422.
- Van Reenen CG, Meuwissen THE, Hopster H, Oldenbrock K, Kruip Th AM, Blokhuis HJ. **Transgenesis may affect farm animal welfare: A case for systematic risk assessment.** *J Anim Sci* 2001; 79:1763-1779.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. **High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1993; 8:1061-1066.
- Varmus H. **Retroviruses.** *Science* 1998; 240:1427-1435.
- Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vázquez JL. **Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa.** *Theriogenology* 2003; 59:1605-1614.
- Ventela S, Okabe M, Tanaka H, Nishimune Y, Toppari J, Parvinen M. **Expression of green fluorescent protein under beta-actin promoter in living spermatogenic cells of the mouse: stage-specific regulation by FSH.** *Int J Androl* 2000; 23:236-242.
- Venugopal T, Anathy V, Kirankumar S, Pandian TJ. **Growth enhancement and food conversion efficiency of transgenic fish *Labeo rohita*.** *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004; 301:477-490.
- Vise PD, Michalska AE, Ashuman R, Lloyd B, Stone AB, Quinn P, Wells JRE, Seamark RR. **Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth.** *J Cell Sci* 1988; 90:295-300.
- Wagner EF, Covarrubias L, Stewart TA, Mintz B. **Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line.** *Cell* 1983; 35:647-655.

- Wagner EF, Stewart TA, Mintz B. **The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice.** Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:5016-5020.
- Wagner JA, Chao AC, Gardner P. **Molecular strategies for therapy of cystic fibrosis.** Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995; 35:257-276.
- Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. **Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection.** J Reprod Fertil 1998; 112:11-17.
- Wakayama T, Yanagimachi R. **Cloning the laboratory mouse.** Semin Cell Dev Biol 1999; 10:253-258.
- Wall RJ. **New gene transfer methods.** Theriogenology 2002; 57:189-201.
- Wall RJ. **Pronuclear microinjection.** Cloning Stem Cells 2001; 3:209-220.
- Wall RJ. **Sperm-mediated gene transfer: advances in sperm cell research and applications.** Transgenic Res 1999; 8:313-315.
- Wall RJ. **Transgenic Livestock: Progress and Prospects for the Future.** Theriogenology 1996; 45:57-68.
- Wall RJ, Hyman P, Kerr D, Pintado B, Wells K. **Transgenic animal technology.** J Androl 1997; 18:236-239.
- Wang HJ, Lin AX, Chen YF. **Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA.** Anim Biotechnol 2003; 14:155-165.
- Wang HJ, Lin AX, Zhang ZC, Chen YF. **Expression of porcine growth hormone gene in transgenic rabbits as reported by green fluorescent protein.** Anim Biotechnol 2001; 12:101-110.
- Wang S, Hazelrigg T. **Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis.** Nature 1994; 369:400-403.
- Wang WH, Abeydeera LR, Han YM, Prather RS, Day BN. **Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced *in vitro* and *in vivo*.** Biol Reprod 1999; 60:1020-1028.
- Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalpra L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, McKenzie IFC, Lavitrano ML. **Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer.** Mol Reprod Dev 2005; 72:68-76.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR. **Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells.** Biol Reprod 1999; 60:996-1005.
- Westendorf P, Treu H, Liedicke A. **Deep freezing of boar's sperma. VIII. Additional laboratory and insemination tests using the Hulsenberger pellet deep-freezing technic]** Dtsch Tierarztl Wochenschr 1975; 82:393-395.

- Wheeler MB. **Development and validation of swine embryonic stem cells: a review.** *Reprod Fertil Dev* 1994; 6:563-568.
- Wheeler MB. **Production of transgenic livestock: promise fulfilled.** *J Anim Sci* 2003; 81:32-37.
- Wheeler MB, Choi SJ. **Embryonic stem cells and transgenics: Recent advances.** *Arch Fac Vet UFRGS* 1997; 25:64-83.
- Wheeler MB, Rund LA, Bleck GT, Izard MM, Grum LR, Davis AM, Hunt ED, White BR, Barnes J. **Production of quimeric swine by embryonic stem (ES) cells.** *Biol Reprod* 1995; 52:319.
- Wheeler MB, Walters EM. **Transgenic technology and applications in swine.** *Theriogenology* 2001; 56:1345-1369.
- Wheeler MB, Walters EM, Clark SG. **Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future.** *Anim Reprod Sci* 2003; 79:265-289.
- Whitelaw CB, Radcliffe PA, Ritchie WA, Carlisle A, Ellard FM, Pena RN, Rowe J, Clark AJ, King TJ, Mitrophanous KA. **Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anemia virus (EIAV) derived vector.** *FEBS Lett* 2004; 571:233-236.
- Whitmer KJ, Calarco PG. **HIV-1 expression during early mammalian development.** *AIDS* 1992; 6:1133-1138.
- Wieghart M, Hoover JL, McGrane MM, Hanson RW, Rottman FM, Holtzman SH, Wagner TE, Pinkert CA. **Production of transgenic pigs harbouring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone fusion gene.** *J Reprod Fertil* 1990; 41:89-96.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. **Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.** *Nature* 1997; 385:810-813. Erratum in: *Nature* 1997; 386:200.
- Wilmut I, Young L, Campbell KH. **Embryonic and somatic cell cloning.** *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:639-643.
- Wu Z, Li Z, Yang J. **Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments.** *Mol Reprod Dev* 2007; Jun 1.
- Wu GM, Nose K, Mori E, Mori T. **Binding of foreign DNA to mouse sperm mediated by its MHC class II structure.** *Am J Reprod Immunol* 1990; 24:120-126.
- Wurst W, Joyner AL. **Production of targeted embryonic stem cells clones.** In *Gene Targeting: A practical approach*. Ed AL Joyner. Oxford University Press, Oxford 1993; 33-61.
- Xu X, Seth PC, Harbinson DS, Foxcroft GR. **Semen dilution for assessment of boar ejaculates quality in pig IVM and IVF systems.** *Theriogenology* 1996; 45:1325-1327.
- Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, Fishman J, Cooper DK, Hawley RJ, Greenstein J, Schuurman HJ, Awwad M, Sykes M, Sachs DH. **Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue.** *Nat Med* 2005; 11:32-34.

- Yamauchi N, Geshi M, Suzuki K, Nagai T. **Effect of Ca²⁺ concentration in the fertilization medium on sperm penetration *in vitro* in pigs.** *Zygote* 1998; 6:114.
- Yamauchi Y, Doe B, Ajduk A, Ward MA. **Genomic DNA damage in mouse transgenesis.** *Biol Reprod* 2007; In press.
- Yanagimachi R. **Mechanisms of fertilization in mammals.** In *Fertilization and embryonic development *in vitro**. Eds L Mastroianni and JD Biggers. Plenum Press, New York 1981: 81-182.
- Yanagimachi R. **Mammalian fertilization.** In *The Physiology of Reproduction*. Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York 1994; 1:189-317.
- Yang CC, Chang HS, Lin CJ, Hsu CC, Cheung JI, Hwu L, Cheng WTK. **Cock spermatozoa serve as the gene vector for generation of transgenic chicken (*Gallus Gallus*).** *Asian Austral J Anim Sci* 2004; 17:885-891.
- Yonemura I, Fujino Y, Irie S, Miura Y. **Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions.** *J Reprod Dev* 1996; 42:89-94.
- Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, Suzuki M, Takahashi M, Nishihara M. **Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer.** *Mol Reprod Dev* 2001; 60:196-201.
- Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. **Protamine derived synthetic peptide enhances the efficiency of sperm-mediated gene transfer using liposome-peptide-DNA complex.** *J Reprod Devel* 2002; 48:281-286.
- Yong HY, Hao Y, Lai L, Li R, Murphy CN, Rieke A, Wax D, Samuel M, Prather RS. **Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm.** *Mol Reprod Dev* 2006; 73:595-599.
- Yu X, Egelman EH. **Structural data suggest that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible.** *J Mol Biol* 1992; 227:334-346.
- Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S, Spadafora C. **The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake.** *Exp Cell Res* 1995; 217:57-64.
- Zannoni A, Spinaci M, Bernardini C, Bacci ML, Seren E, Mattioli M, Forni M. **DNase I activity in pig MII oocytes: implications in transgenesis.** *Reproduction* 2006; 131:461-468.
- Zelenin AV, Titomirov AV, Kolesnikov VA. **Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection.** *FEBS Lett* 1989; 244:65-67.
- Zhang X, Baader SL, Bian F, Muller W, Oberdick J. **High level Purkinje cell specific expression of green fluorescent protein in transgenic mice.** *Histochem Cell Biol* 2001; 115:455-464.

- Zhong JY, Wang YP, Zhu ZY. **Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus.** *Aquaculture* 2002; 214:93-101.
- Zoraqi G, Spadafora C. **Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome.** *DNA Cell Biol* 1997; 16:291-300.
- Zuelke KA. **Transgenic modification of cows milk for value-added processing.** *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:671-676.



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
FACULTY OF VETERINARY

SPERM MEDIATED GENE TRANSFER (SMGT) IN PIGS

DOCTORAL THESIS

Francisco Alberto García Vázquez

Murcia, December 2007

SUMMARY

The transgenesis is a powerful biotechnological tool for the generation of genetically modified animal with applications in different areas such as veterinary medicine, biomedicine and agriculture. In 1989, the research group directed by *Dr. Marialuisa Lavitrano* described a new method for transgenic animal production; the known as **sperm mediated gene transfer** (SMGT). This method is based on the intrinsic ability of the spermatozoa to bind exogenous DNA and to allow its transference to the oocytes after fertilization, and to integrate in the genome of the new embryo. The global objective of this study was to develop an efficient method of *in vitro* production of transgenic embryos and piglets using the spermatozoa capacity to bind to exogenous DNA. Different factors which could affect the performance were analyzed by studying: 1) The capacity of transference of exogenous DNA by the pig spermatozoa; 2) The effect of different sperm treatments on the *in vitro* transgenic embryos production; and finally, 3) The evaluation of *in vivo* transgenic embryos and piglets production.

In order to obtain the proposed **objectives**, firstly, we evaluated the interaction between transgene and the spermatozoa studying the percentage of exogenous DNA binding in different sperm treatments, culture media, binding kinetic between spermatozoa and DNA, and the location of this interaction. For this, diverse techniques of analysis were used such as optical microscopy, fluorescence microscopy, flow cytometry and transmission electronic microscopy. Secondly, we evaluated the capacity of transgenic embryo production, using *in vitro* fertilization (IVF and ICSI) after diverse sperm treatments. Thirdly, we tried to apply the results obtained in the laboratory to the embryo and transgenic pigs production using different reproductive biotechnologies (surgical and non surgical deep intrauterine inseminations, embryo transfer).

In the **first set of experiments**, the results of the study indicated that the presence of the seminal plasma inhibited the interaction of the spermatozoa with the DNA. Sperm membranes permeabilization increased the percentage of binding. This DNA-spermatozoa interaction takes place during within the first 15 minutes of incubation. In addition, the DNA binding is associate to the destabilization of the sperm membranes and therefore it is necessary to optimize preparation method of the spermatozoa to be able to obtain the greater number of alive spermatozoa able to transport DNA.

In relation to the location of the transgene in the spermatozoa, we observed, using transmission electronic microscope, that DNA were bound to the postacrosomal region, to acrosome and the acrosomal matrix, in addition to the equatorial region close to the sperm nucleus.

In relation to the **second set of experiments**, the results indicate that, under our laboratory conditions, *in vitro* fertilization (pig IVF-SMGT) was not effective for obtaining any transgenic embryos. We are unaware of any other group which has achieved this. Nevertheless, the use of the ICSI has enabled us to obtain a high percentage of transgenic embryos that expressed protein EGFP. Incubation of spermatozoa with RecA protein had a significant effect on transgenic embryo production, where 90% of embryos produced were transgenic.

Finally, in relation to *in vivo* development, we did not obtain any transgenic embryos nor piglets using intrauterine inseminations whether surgical and non surgical. With respect to embryo transfer, we obtained one pregnancy with 8 piglets born (the first piglets born in Spain by means of ICSI). Two piglets were transgenic, being the first transgenic pigs been born in Europe by means of technique SMGT-ICSI and first in the world by the combination of SMGT-ICSI and recombinase.

In **conclusion**, the combination of the ICSI technique and SMGT is a efficient method for the production of transgenic embryos and pigs. The efficiency was increased by the use of recombinase RecA.

MATERIAL AND METHODS

The experiments related to this Doctoral Thesis were developed after the authorization of the Bioethics Committee from the University of Murcia, and according to the European and Spanish rules for protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes and genetically modified organisms (GMO). Unless otherwise indicated, all chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

3.1 SPERM EVALUATION

3.1.1 ANIMALS

Used semen came from boars of proved fertility belonging to the artificial insemination centre of the farm "Lo Navarro" S.A. (Murcia, Spain).

3.1.2 MEDIUM USED FOR SPERMATIC PROCESSING

The medium used for spermatozoa dilution and washing was the *Swine Fertilisation Medium* (SFM) (Table 1). This medium was subsequently supplemented with 6 mg/ml of Bovine Serum Albumin (BSA). Final pH of the medium was adjusted to 6.8.

TABLE 1. SFM/BSA media for processing of boar spermatozoa.

Component	Concentration (g/l)
Glucose	11.25
Sodium Citrate•2H ₂ O	10
EDTA	4.7
Citric Acid•H ₂ O	3.25
Trizma	6.5

3.1.3 DNA CONSTRUCTION AND LABELLING (Rhodamine/ Fluorescein/ Digoxigenin)

Construction of the gene which codes for EGFP is as follows: plasmid pEGFP-N1 (which contains early promoter human CMV and gene EGFP) was obtained from *Clontech* (pEGFP-N1, 5.7 Kbp, Clontech Laboratories, Inc.; Palo Alto, CA, USA). pEGFP polylinker was eliminated and an adapter Bcl I-Hind III was inserted in the place of Afl III.

To obtain the plasmid at 10.3 Kbp, plasmid MAR-CMV was firstly created, where the regions of matrix accessory (MAR: 2.3 Kbp) (which were the elements of the human gene of β -interferon) were sub-cloned in the adapter before CMV promoter. Three elements Kb Bcl II-Hind III MAR isolated from human gene β -interferon were sub-cloned in Bcl I adapter. Finally, another MAR element is placed behind transgene. To carry out construction, a BanHi-EcoRi adapter was used; it was inserted in the *Stul* place of the MAR-CMV-EGFP plasmid. The human MAR element of β -interferon was sub-cloned forming a MAR-CMV-EGFP-MAR plasmid. The MAR element was kindly provided by *M. Kalos* (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Washington, USA).

Linear plasmid was labelled with fluorescein-12-dUTP (*Roche*[®], Germany), with digoxigenin-11-dUTP (*Roche*[®], Germany), or with rhodamine-11-dUTP (*Proligo*[®], France). DNA labelling was carried out by means of *random primer*. Briefly, mould DNA (linearized plasmid) was denatured by application of 95°C for 5 min; nucleotides (1 mM of dATP, dCTP, and dGTP; 0.65 mM of dTTP, and 0.35 mM of the marked nucleotide) were added later, 5x buffer and 1U/ μ l Klenow. Subsequently, the mixture was incubated for an hour at 37°C; reaction

is stopped by adding 2 µl of 0.2 M EDTA (pH 8). Marked DNA precipitated out with cold ethanol and is finally resuspended in water. Verification of plasmid marking was determined in an agarose and dyeing gel with ethidium bromide. The incorporation of the labelled nucleotide to synthesized DNA diminishes its electrophoretic mobility in respect to non-marked DNA (Gutiérrez-Adán & Pintado 2000).

3.1.4 SEMEN RECOVERY

3.1.4.1 Ejaculated spermatozoa recovery

Sperm rich fractions were collected by an experienced operator using the gloved hand technique (King & Macpherson 1973). The ejaculate was filtered and immediately placed at 37°C. The semen was then diluted with isothermal *Swine Fertilisation Medium* (SFM) without BSA at a ratio of 1:1 (v/v).

3.1.4.2 Epididymal spermatozoa recovery

Spermatozoa came from the cauda epididymidis of healthy male pigs slaughtered at a local abattoir. Epididymidis and testicles were washed with softened saline solution. Subsequently, the duct was washed with 2 ml of BTS using a 21 G needle joint to a syringe of 5 ml. Samples were analysed and only those in which sperm population kept its membrane integrity over 80% were used.

3.1.5 EVALUATION OF SPERMATIC FUNCTIONALITY

3.1.5.1 Routine laboratory evaluation of semen

Sperm concentration was evaluated by the use of a spectrophotometer (*Spermacue*, Minitüb®, Tiefenbach, Germany). The volume of the sperm-rich fraction of the ejaculate was determined in a graduated cylinder. To evaluate the motility and the forward progressive motility (FPM), 2 subsamples were placed on warm glass slides (38°C) and examined under a light microscope (10X

magnification). The percentage of motile sperm cells was estimated subjectively to the nearest 5%, and the FPM was estimated using an arbitrary scale of 0 to 5.

Wet mounts of semen fixed in buffered 0.3% formaldehyde solution were examined under a phase-contrast microscope (100X magnification, *Leica*[®] DMR) to analyze morphology. Two hundred spermatozoa were categorized according to sperm morphology into those with normal morphology, cells with attached proximal cytoplasmic droplets, distal cytoplasmic droplets, folded tail, coiled tail and others (abnormal heads, etc).

3.1.5.2 Evaluation of membrane integrity

Sperm membrane integrity was assessed by incubation in a solution containing 20 µl of carboxyfluorescein diacetate (CFD), to which 20 µl of propidium iodide (PI), 10 µl of formalized saline solution, 100 µl of the sample of semen and 900 µl of SSF were added (Harrison & Vickers 1990).

This suspension was evaluated by fluorescence microscopy (100X magnification, *Leica*[®] DMLS), on at least 200 cells/sample.

We classified observed spermatozoa into two groups: 1) Cells with green fluorescence: intact membrane integrity; and 2) Cells with red fluorescence: altered membrane integrity.

3.1.5.3 Evaluation of lipid disorder in plasma membrane

To detect increase in plasma membrane lipid packing disorder, sperm samples were stained with merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1 (Harrison *et al.* 1996). Stock solutions of M540 (1 mM) and Yo-Pro 1 (25 µM, Molecular Probes, Eugene, OR) in DMSO, were prepared. M540 fluorescence was collected with a FL2 sensor using a 575 nm band-pass filter and Yo-Pro 1 with a FL1 sensor using a 525 nm band-pass filter. Cells were classified in three categories: 1) Low merocyanine fluorescence (viable, un-capacitated), 2) High merocyanine fluorescence (viable, capacitated) or 3) Yo-Pro-1 positive (dead).

Flow cytometric analyses were performed on a *Coulter Epics XL* (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA).

3.1.6 SPERMATOZOA PROCESSING AND INCUBATION WITH DNA

3.1.6.1 Processing of ejaculated spermatozoa

Semen was prepared according to the method described by *Lavitrano et al.* (2000). After collection of the sperm rich fraction of ejaculate and the semen was diluted 1:1 in medium SFM without BSA, it was transported to the lab at 37°C. Once in the lab, it was diluted again in medium SFM (37°C) in 1:10 proportion in *Falcon*[®] tubes, and was centrifuged at 800g for 10 min at 25°C (*Eppendorf* 5810R Centrifuge, Madrid, Spain). Supernatant was discarded and the pellet was resuspended in SFM (with BSA in this case) at 25°C, centrifuged again at 800g for 10 min at 25°C; supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 ml of medium with BSA at 25°C. Motility was evaluated again once spermatozoa processing has finished (for its use, it should reach a motility over 65% and a progressive motility no less than 2.5) and final concentration is calculated by *Spermacue* (Minitüb[®]). Finally, concentration of sperm suspension was adjusted to 10⁸ sperm cells/ml, to which 5 µg of exogenous DNA/ml were added (stock solution DNA 200 µg/ml). This is the proportion which will be used in the following experiences.

3.1.6.2 Processing of epididymal spermatozoa

Epididymal spermatozoa were suspended after recovery in SFM medium and centrifuged at 800g for 10 min at 25°C; subsequently, after discarding the supernatant, they were resuspended in SFM, but with BSA in this case, being centrifuged again in same conditions to those previously described. Supernatant was discarded and 1 ml of medium with BSA at 25°C was added. Finally, concentration of sperm suspension is adjusted to 10⁸ sperm cells/ml to which 5 µg of exogenous DNA/ml were added.

3.1.7 SPERM TREATMENTS

Spermatozoa, once they had been processed (*section 3.1.6*), were subject to different kinds of treatments to be subsequently used in different experiences. The following treatments were carried out:

1) Permeability of membranes with detergent Triton X-100: The treatment with a solution of Triton X-100 was prepared according to the protocol described by *Perry et al.* (1999). 100 µl of Triton X-100 at 0.5% were added to 900 µl of sperm suspension. After incubation at room temperature for 10 min, sample was centrifuged twice (3 min at 10.000g). Pellet was recovered and resuspended in SFM medium with BSA.

2) Freezing and thawing: Semen samples were processed using the straw freezing procedure described by *Westendorf et al.* (1975) and preserved in liquid nitrogen straws up to 0.5 ml until use. Thawing was achieved by immersing the straws in a circulating water bath at 50°C for 12 sec. Immediately after thawing the semen was diluted in SFM (softened to 37°C, 1:5 ratio). Sample was washed twice by centrifugation for 10 min at 800g at 25°C to eliminate freezing medium and cellular rests. Finally, pellet was suspended in SFM medium until it reached the working concentration (10^8 spermatozoa/ml).

3) Membrane breaking by quick freezing/thawing: To prompt structural alteration of sperm membranes, spermatozoa were subject to a quick and repeated process of freezing/thawing. We introduced a suspension of intact spermatozoa into a liquid-nitrogen bath for 20 sec, followed by immediate thawing in a bath of softened water at 37°C. This process was repeated three times. After the process, it was confirmed that all sperm cells had serious alterations of the structure of their membrane.

4) Treatment with dimethyl sulfoxide (DMSO): The protocol previously described by *Shen et al.* (2006) and *Li et al.* (2006) was followed for murine and rabbit species. Spermatozoa, once they have been processed (*section 3.1.6*), were supplemented with DMSO (diluted in SFM medium) until reaching a final concentration of 0.3% and 3%.

5) Sperm capacitation: For the development of sperm capacitation, medium TALP (*described in the section 3.2.3*) was used; solution's final pH was adjusted to 7.4 in an incubator at 5% of CO₂ and 38.5°C, and in humidity saturated atmosphere for 20 h, prior to use. Processed spermatozoa were kept in TALP solution for 30 min in the incubator (in the same conditions previously described) and transgene was subsequently added, keeping the same conditions during analysis.

6) Bacterial recombinase RecA: RecA:DNA complexes were prepared as described by *Kaneko et al.* (2006). Preparation of RecA-complexed DNA was initiated by the removal of the 50% glycerol in which RecA (Epicentre, Madison, WI) is shipped, using gel filtration through a Microspin G-25 column (Amersham, Little Chalfong, UK) following the manufacture is instructions. The column was washed briefly by placing 70 μ l of 13 TKM buffer (25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$) into the center of the column bed and centrifuging at 735g for 1 min at 48°C. This centrifugation step was repeated three times, with each spin lasting for 2 min, and the flow through discarded. A volume of 35 μ l of RecA was mixed with an equal volume of a double-strength TKM buffer, placed in the centre of the column bed, and centrifuged for 2 min at 48°C. The flow through without glycerol was then mixed with denatured DNA. The denaturing was accomplished with 5 min incubation at 95°C in TKM buffer. Denatured ssDNA was quenched on ice, and the appropriate quantity of RecA solution was added in order to satisfy a 40:1 protein:DNA (weight:weight) ratio, ensuring coating of all ssDNA and a final DNA concentration of 10 ng/ μ l. The mixture was incubated in ice for 1 h and then mixed with fresh semen. These complexes (RecA:DNA:spermatozoa) were measured using percentage of link with flow cytometer and for transgenesis by IVF and ICSI.

3.1.8 EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN DNA AND SPERMATOZOA

3.1.8.1 Evaluation of spermatozoa-DNA binding by fluorescence microscopy

Semen was prepared as described on *section 3.1.6*, using DNA labelled with rhodamine (*section 3.1.3*). Spermatozoa were evaluated at 100X magnification using a microscope equipped with epi-fluorescence (*Leica*[®], DMLS model), with a filter of maximum adsorption of 511 nm, and classified into two groups: 1) Spermatozoa bound to DNA (labelled with rhodamine-red colour); 2) Spermatozoa non-bound to DNA (non-labelled with rhodamine). A minimum of 200 spermatozoa were evaluated in each sample.

3.1.8.2 Evaluation of spermatozoa-DNA binding by flow cytometry

Flow cytometric analyses were performed on a *Coulter Epics XL* cytometer (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA). Data from 10000 events per sample were collected in list mode, and 4 measures per sample were recorded. Fluorescence intensity of spermatozoa was analysed by green fluorescence register (FL1), collected through a filter of 525 nm, and red fluorescence register (FL3) was carried out through a filter of 575 nm.

3.1.8.2.1 Study of binding kinetics between sperm cells and exogenous DNA

To study kinetics of spermatozoa-DNA binding, measurements were carried out by cytometer at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. The initial analysis was when spermatozoa (*section 3.1.6*) mixed with DNA marked with fluorescein (*section 3.1.3*) 100 µl of sample were pipetted and added to 4 ml of PBS before measurement in each established times.

3.1.8.2.2 Evaluation of the DNA binding capacity and sperm viability

To carry out several studies on DNA binding capacities and evaluate cellular viability simultaneously, the use of two fluorochromes was necessary. Spermatozoa were incubated with DNA labelled with fluorescein and propidium iodide, and measured by flow cytometer as previously described.

When using two fluorochromes simultaneously, it is possible to distinguish 4 sperm sub-populations which are described next: 1) Live spermatozoa without bound DNA (no sign of any fluorescence), 2) Live spermatozoa with bound DNA  (only green fluorescence), 3) Dead spermatozoa with bound DNA  (red and green fluorescence), and 4) Dead spermatozoa without bound DNA  (red fluorescence).

3.1.8.3 Determination of the interaction place between transgene and spermatozoa

Spermatozoa were processed and incubated with DNA following the

protocol previously described (*section 3.1.6*). In these studies, used DNA had been previously labelled with digoxigenin (DIG) (*section 3.1.3*). Fresh spermatozoa, quick frozen and frozen/thawed spermatozoa were used (*section 3.1.7*). Spermatozoa were classified according to DNA localization in the spermatozoa: 1) DNA bound in acrosomal region, 2) DNA bound in post-acrosomal region, 3) DNA bound in acrosomal and post-acrosomal regions, and 4) Non-bound DNA.

3.1.8.3.1 Ab-Horseradish peroxidase (HRP) test

Test with horseradish peroxidase (HRP) consists of using an antibody labelled with the enzyme HRP (antidigoxigenin-POD, *Roche*[®]) against the digoxigenin (DIG) antigen, which in contact with an oxidizing agent like hydrogen peroxide (H₂O₂) generates a brown coloration signal. The followed protocol is detailed next:

- 1) Spermatozoa were incubated with plasmid labelled with DIG, following the process described in *section 3.1.3*.
- 2) After incubation period (24 h), spermatozoa were centrifuged at 300g for 5 min for washing and elimination of non-bound plasmid, which could interfere in marking.
- 3) Precipitate was fixed by re-suspension in 1% paraformaldehyde and preserved at 4°C until the moment of use.
- 4) For this test, spermatozoa were previously washed in PBS by centrifugation at 300g for 5 min with the aim of eliminating medium's fixer. Precipitate was finally re-suspended in PBS, in which adjustment of used final concentration is carried out.
- 5) With resulting suspension, spermatozoa' extensions were made using an object-holder.
- 6) Extensions, once they had been air dried, were washed 3 times for 5 min in PBS. For that reason, all object-holders were immersed in a glass cuvette with the help of a test tube rack.
- 7) For blockade of cellular endogenous peroxidase activity, a solution of 1 ml of H₂O₂ in 100 ml of PBS was prepared. Object-holders were kept for 30 min in that solution.
- 8) They were washed again in PBS 3×5 min with the aim of eliminating H₂O₂ excess which might be left in medium.

- 9) Prior to incubation with antibody, object-holders were immersed in PBS at 1% BSA for 15 min with the aim to avoiding antibody's possible unspecific links.
- 10) Next, samples were incubated using a humidity cabinet at room temperature, with antibody antiDIG-HRP previously diluted 1:100 in PBS-1% BSA (495 μ l of PBS-BSA 1% and 5 μ l of Ab) for 60 min.
- 11) We wash them again at 300g for 5 min.
- 12) Once incubation time had finished, we observed HRP by the use of the following solution:
 - A vial of Diaminobenzidine (DAB) 90 μ l
 - 100 ml of PBS
 - 100-200 μ l of H₂O₂

To carry out observations, samples should be kept in revealing solution for 30 min.

- 13) Once revealing had finished, samples should be washed carefully with water three times during 5 min.
- 14) Samples should be air dried previously to their mounting.
- 15) Finally, we prepared samples for microscopy observation placing object-covers with DPX mounting medium.

Spermatozoa evaluation was carried out using optical microscope (*Leica*[®], DMLS) under immersion objective (100X).

3.1.8.3.2 Ab-Fluorescein Test (Ab-FITC)

This test consists of using antibody (Ab) antiDIG labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Antidigoxigenin-Fluorescein, *Roche*[®]), which allows to evidence it by use of fluorescence microscopy. The followed protocol is detailed next:

- 1) Spermatozoa were incubated with plasmid marked with DIG.
- 2) Once incubation period (24 h) had passed by, spermatozoa were centrifuged at 300g for 5 min in order to eliminate non-bound plasmid excess.
- 3) Precipitate was re-suspended for its fixation in 1% paraformaldehyde and preserved at 4°C until the moment of labelling.
- 4) For this assay, spermatozoa were previously washed by centrifugation at 300g for 5 min and precipitate was re-suspended in PBS.

- 5) From resulting suspensions, extensions of spermatozoa were carried out in their corresponding object-holders.
- 6) Extensions, once they had been air dried, were washed 3 times for 5 min in PBS.
- 7) To avoid antibody's unspecific links, we carry out a previous blocked with PBS at 1% of BSA for 15 min.
- 8) We incubated them in a humidity cabinet (to avoid drying of the medium with antibody) at room temperature with antibody antiDIG-FITC (diluted 1:10 in PBS-1% BSA: 495 μ l of PBS-BSA 1% and 5 μ l of Ab) for 60 min.
- 9) A new sample washing was carried out (3 washings during 5 min).
- 10) Without drying, we mount object-covers with samples using round object-covers and fluorescence mounting medium (*Dako. Fluorescent Mounting Medium*).

Spermatozoa were analysed using fluorescence microscopy (*Leica*[®], DMLS) by excitation filter at 580nm and under immersion objective (100X).

3.1.8.3.3 Colloidal gold assay

For this test, we carried out immunocytochemistry previously after fixation of spermatozoa (*In Toto*) on a copper grid and subsequently incubating them with antibody antiDIG labelled with colloidal gold (anti-antiDIG marked with colloidal gold, EM-GOAT ANTIMOUSE IgG+IgM: 15nm Gold, BB International). Grid preparation is detailed below:

- 1) We placed around 3 μ l of sperm suspension on a copper grid and let it dry for 60 min. Once spermatozoa were fixed to the surface of the grids, these were placed on drops made on a plastic surface elaborated with *Parafilm* in the following steps.
- 2) We washed in drops (50 μ l) of PBS for 5 min.
- 3) We blocked unspecific links placing grids on drops (50 μ l) of PBS and 1% BSA (10 min).
- 4) We incubated them with first monoclonal antibody antiDIG for 60min (Antidigoxigenin, *Roche*[®]) using drops of 15-20 μ l.
- 5) We washed them again with PBS three times for 5 min to eliminate non-bound Ab.
- 6) To avoid antibody's unspecific links, we carried out a previous blockade with NGS (*Normal Goat Serum*) for 60 min.
- 7) We incubated them with second antibody, marked with colloidal gold and

specific for the constant region of the first Ab for 60 min.

- 8) Samples were washed them with PBS three times for 5 min.
- 9) Samples were washed thoroughly with double distilled water.
- 10) Once grids had been properly washed, we let them air dry on filter paper, trying to place the surface which contains spermatozoa in the upper side.

Once grid-marking process had finished, spermatozoa were analysed by electronic microscopy: direct observation by microscopy PHILIPS TECNAI 12.

3.2 EVALUATION OF IN VITRO PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS

3.2.1 ANIMALS AND BIOLOGICAL MATERIAL

Porcine oocytes were collected from fresh ovaries from prepuberal gilts weighing approximately 95 kg, just after slaughter at a local abattoir (*Fuertes S.A.* placed in Alhama de Murcia, Murcia, Spain) and transported in less than 90 min to the laboratory in 0.9% (wt/vol) NaCl containing 100 µg/ml kanamycin sulphate at 30°C.

3.2.2 WASHING AND GAMETE MANIPULATION MEDIA

Media used for ovary transport, washing and oocyte collection were the following:

- **Saline Solution (SS)**: 0.9% w/v NaCl with 100 mg/l of kanamycin sulphate.
- **Cetrimide Solution** (Hexadecil-trimetilamonie bromure: Cetab) 0.04% (w/v).

Both solutions were prepared with ultrapure water (Mili-RX) and were maintained at room temperature until use.

- **Dulbecco modified Phosphate saline (D-PBS)** (Sigma D-8662) supplemented with 1 mg/ml of alcohol polyvinyl and 0.005 mg/l of phenol red as pH indicator. This medium was stored at 4°C until use.

The medium used for matured oocyte washing and during the injection consisted of **supplemented D-PBS** with 10% (v/v) of fetal calf serum (FCS; Biological Industries®, Haemek, Israel).

3.2.3 CULTURE MEDIA AND SUPPLEMENTS

NCSU-37 stock medium. A stock solution was prepared in the laboratory (Table 2) with ultrapure water (Milli-Q). Then, it was sterilized by filtration through 0.22 µm filters, and it was stored in sterile conditions at 4°C during two weeks.

TABLE 2. Composition of NCSU-37 stock medium (Peters & Wells 1993).

Component	Concentration (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.70
Glucose	5.55
D-Sorbitol	12.00
Penicilina G sodic	0.18
Streptomycin Sulphate	39.00 UI/ml

For IVM, NCSU-37 stock medium was supplemented with cysteine, β-mercaptoethanol, insuline, dbAMPc, porcine follicular fluid (PFF), PMSG and hCG (Foligón, Chorulón; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) as described by *Funahashi et al. (1997)* (Table 3).

TABLE 3. NCSU-37 medium supplements for *in vitro* porcine oocyte maturation (Funahashi *et al.* 1997).

Component	Concentration (mM)
Cysteine	0.57 mM
β -mercaptoetanol	50.00 μ M
Insuline	5.00 mg/l
dbAMPc	1.00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
hCG	10 UI/ml

TALP medium. Stock solution (*Table 4*) was prepared in the laboratory with ultrapure water. Sterilization was done by filtration and the medium was stored under sterile conditions at 4°C during two weeks.

TABLE 4. Composition of TALP stock medium (Rath *et al.* 1999).

Component	Concentration (mM)
NaCl	114.06
NaHCO ₃	25.07
KCl	3.20
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.35
MgCl ₂ •6H ₂ O	0.50
Lactate Ca•5H ₂ O	8.00
Lactate sodic	10.00
Glucose	5.00
Cafeine	2.00
Kanamycin sulphate	0.17
Phenol red	0.003
PVA	1 mg/ml

For the culture post ICSI, TALP stock medium was supplemented with 3 mg/ml of bovine serum albumin (BSA-FAF) and 0.12 mg/ml of sodium pyruvate (Rath *et al.* 1999). The pH was adjusted to 7.4 in the incubator at 5% of CO₂, 38.5°C and saturate humidity atmosphere for 20 h before use.

NCSU-23 medium. Following the protocol of *Peters & Wells* (1993) the stock solution (*Table 5*) was prepared with ultrapure water, and it was further filtrated and stored at 4°C during two weeks. At the time of using for EC, NCSU-23 stock was supplemented with 4 mg/ml of BSA-FAF, insuline 0.57mM, β-mercaptoethanol 50 μM, 2% v/v BME (Aminoacids solution 50x) and 1% v/v MEM (non-essential amino acid solution 100x). Finally the solution was filtered and kept in the incubator for one day before use.

TABLE 5. Composition of NCSU-23 stock medium (Peters & Wells 1993).

Component	Concentration (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.70
Glucose	5.55
Taurine	7.00
Hipotaurine	5.00
Penicilina G sodic	0.18
Streptomycin sulphate	39 UI/ml

3.2.4 *IN VITRO* MATURATION (IVM) OF OOCYTES

The medium used for oocyte maturation was NCSU-37 (Peters & Wells 1993) supplemented with 0.57 mM cysteine, 1 mM dibutyryl cAMP, 5 μg/ml insulin, 50 μM β-mercaptoethanol, 10 IU/ml eCG (*Foligon*[®], Intervet International B.V., Boxmeer, Holland), 10 IU/ml hCG (*Chorulon*[®], Intervet International B.V.,

Boxmeer, Holland), and 10% porcine follicular fluid (v/v).

Within 30 min of slaughter, ovaries from prepuberal gilts were transported to the lab in saline containing 100 µg/ml kanamycin sulfate at 38°C, washed once in 0.04% cetrimide solution and twice in saline. Oocytes-cumulus cell complexes (COCs) were collected from antral follicles (3-6 mm diameter) by slicing, washed twice with Dulbecco's PBS supplemented with 1 mg/ml PVA and twice more in maturation medium previously equilibrated for a minimum of 3 h at 38.5°C under 5% CO₂ in air. Only COCs with a homogeneous cytoplasm and a complete and dense *cumulus oophorus* were used for the experiments. Groups of 50 COCs were cultured in 500 µl maturation medium for 22 h at 38.5°C under 5% CO₂ in air. After culture, oocytes were washed twice in fresh maturation medium without dibutyryl cAMP, eCG and hCG and cultured for an additional 20-22 h (Funahashi & Day 1993). This *in vitro* maturation system is commonly employed in pigs for several years and it is based upon the results from Funahashi *et al.* in 1997.

3.2.5 INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)

Oocytes cultured for 44 h in maturation medium were mechanically denuded by gentle aspiration with a pipette. Denuded oocytes were washed twice in supplemented DPBS medium and transferred to ICSI drops. ICSI was conducted on a heated microscope at 20X magnification using a *Nikon Diaphot 300* inverted microscope with micromanipulators. The ICSI medium used was DPBS supplemented with 10% FCS. Prior to ICSI, oocytes were placed in a lid of *Petri* dish (1 oocyte per drop of 4 µl of DPBS-FCS). In total 10-15 micro-drops were placed in each lid surrounding central sperm drops which contained 4 µl of DPBS-FCS and 1 µl of the sperm suspension. The microdrops were covered with mineral oil (Sigma M-8410). ICSI was performed as described by Probst & Rath (2003). Briefly, one single sperm was immobilized by crushing the mid-piece with the tip of the injection pipette. The immobilized sperm was aspirated with the tail first. Thereafter, the injection pipette was moved into the drop containing the oocytes to be injected. A single oocyte was fixed with the holding pipette, positioning the polar body in a 6 or 12 o'clock position. The injection pipette was pushed through the *zona pellucida* and the oolema into the cytoplasm at the 3 o'clock position. Small amounts of cytoplasm were sucked into the injection pipette in order to prove that the sperm was introduced through the oolema into the cytoplasm. Subsequently, the aspirate with the immobilized spermatozoa

was released into the cytoplasm. The temperature was maintained at 38.5°C through the whole procedure using a heated microscopical stage. The injected oocytes were placed in TALP medium.

3.2.6 PREPARATION OF SPERMATOZOA FOR ICSI

Preparation of spermatozoa (which were subject to different processes: intact, frozen-thawed, quick freezing, Triton X-100, RecA) used for *in vitro* fecundation by ICSI, was carried out as described on *sections 3.1.6 and 3.1.7*.

Semen and DNA were incubated for a minimum of 30 min at 16°C. After this incubation period, sperm suspension was heated for 30 min at 38.5°C, as a step prior to ICSI process.

Two µl of corresponding sperm suspension were completed with 500 µl of PBS (preheated up to 38°C), supplemented with bovine foetal serum at 10% for dilution. One µl of this sample was placed in each central drop (4 µl PBS) of the *Petri* plate used for microinjection (*described in section 3.2.5*).

3.2.7 *IN VITRO* FERTILIZATION (IVF)

Oocytes cultured for 44 h in maturation medium were mechanically denuded by gentle aspiration with a pipette. Oocytes were disposed in groups of 25 in plates with 4 wells with 250 µl of TALP fecundation medium. Subsequently, spermatozoa prepared in a suspension of 250 µl in TALP medium were added. After 2 h of incubation, oocytes were softly pipetted to eliminate those spermatozoa stuck on *zone pellucida*. After this processs, the oocytes were washed twice and finally disposed in micro-drops with embryo culture medium NCSU-23.

3.2.8 PREPARATION OF SPERMATOZOA FOR *IN VITRO* FERTILIZATION

Used spermatozoa are those described in *sections 3.1.6* (intact spermatozoa and intact incubated with DNA) *and 3.1.7* (spermatozoa incubated

with DNA and RecA). Spermatozoa concentration used for *in vitro* fecundation ranged between $0.25-1 \times 10^6$ spermatozoa per each 25 oocytes, depending that concentration on the sperm quality after the followed treatment.

3.2.9 EMBRYO CULTURE

After 2 h (in the case of IVF) and 20-24 h (in the case of ICSI), putative zygotes were washed three times in NCSU-23 previously equilibrated overnight, transferred into micro-drops at a rate of 1 μ l of NCSU-23 media/embryo and covered with mineral oil (embryo tested) in a 4-well *Nunc* multidish containing 500 μ l per well, and incubated at 38.5°C and 5% CO₂ in 100% humidified air. Forty eight and 144 h after fertilization, cleavage rate and blastocyst formation, respectively, were evaluated under a stereomicroscope.

3.2.10 MICROSCOPIC EVALUATION OF THE EMBRYOS

3.2.10.1 Assesment of embryo development

Cleaved embryos were considered those that appear in two-four cells (homogeneous blastomeres) after 48 h post injection. Following 7 days of culture, the zygotes that were visually blastocyst like were isolated under stereomicroscope and were put in warm PBS. Then, embryo quality was assessed. Number of blastomeres per embryo was counted (Dobrinsky *et al.* 1996). Briefly, the oocytes were fixed in alcohol during 24 h; afterwards, they were stained with Hoescht 33342 solution with 1% in PBS to stain the nucleus. Finally, they were assessed under in a fluorescent microscope at 40X and 495 nm wavelength. All nuclei were counted like the total number of nucleus per blastocyst. The variables were:

- Rate of cleaved embryos (**% Cleavage**): The numbers of embryos in 2-4 cells stage were counted in relation to the total embryos injected and cultured.
- Rate of blastocyst (**% Blastocyst**): the number of blastocyst in relation to the total embryo cleaved.
- Average number of cells per blastocyst (**N° cells/blastocyst**): the average number of stained nucleus per blastocyst.

3.2.10.2 Evaluation of transgenic embryos

The expression of green fluorescent protein GFP in embryos was evaluated 7 days after fertilization by IVF or ICSI, calculating the percentage of embryos which expressed it partially or totally. An inverted fluorescence microscope was used (*Nikon*[®], Diaphot 300) with an excitation range of 395-470 nm and an emission spectrum of 509 nm. Embryos were classified into two groups: 1) Embryos expressing green fluorescent protein (emit green fluorescent light), and 2) Embryos no expressing green fluorescent protein (there is no sign of fluorescence).

3.3 INSEMINATIONS AND EMBRYO TRANSFER (EVALUATION OF *IN VIVO* PRODUCTION OF EMBRYOS AND TRANSGENIC PIGLETS)

3.3.1 ANIMALS

A total of 12 hybrid commercial females were used. For non-surgical inseminations experiences, 4 multiparous sows, two of them *Duroc* breeds and the other two *Landrace* and *Large White* crossbreed. For surgical inseminations and embryo transfer experiences, 8 pre-pubertal *Landrace* and *Large White* crossbreed gilts were used.

3.3.2 OESTRUS INDUCTION AND DETECTION

With the purpose of synchronizing oestral cycle in the of multiparous sows, prostaglandins PG-F2 α (*Dinolityc*[®]) were injected intramuscularly (IM) 15 days after last cycle, in order to produce lysis of possible corpus lutea. For induction of oestrus and super-ovulation in both multiparous (48 h after the injection of prostaglandins) and pre-puber females, 1250 U.I. of Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) (*Folligon*[®], Intervet) were administered intramuscularly, followed after 72 h by 750 IU of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) (*Veterin Corion*[®], Divisa Farmavic S.A., Barcelona, Spain). Oestrus detection was carried out every 6 h, beginning 32 h after the hCG injection, by determination of immobility reflect and aspect of vulva, and by ultrasonography techniques.

3.3.3 OVULATION AND EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS BY ULTRASONOGRAPHY

We used a 100 FALCO-VET scan (Esaote España S.A., Barcelona, Spain), for both gestation diagnosis and monitoring of follicular growth and ovulation moment, equipped with a 6-8 MHz) endorectal transducer and a 5-7.5 MHz microconvex transducer for trans-abdominal application. Oestrus and ovulation detection was carried out by tracking follicular growth (anechoic areas in ovary with size around 3-6 mm), beginning 32 h after the hCG injection. On the other hand, early gestation diagnosis was carried out 25-28 days after insemination or embryo transfer.

3.3.4 DEEP INTRAUTERINE INSEMINATION

3.3.4.1 Semen preparation

Semen was prepared as previously described in *section 3.1.6*, using intact semen (fresh). Samples concentration of 100×10^6 spermatozoa/250 μ l DNA (DNA stock solution 200 ng/ μ l) in a total volume of 10 ml of SFM/BSA media was prepared. This suspension was incubated for 2 h at 16°C, moving test tubes at certain times to avoid sedimentation. Sample was heated at 37°C for 10 min before insemination. Two inseminations (separated by 12 h) were carried out for each pig, with semen from the same ejaculate, preserved at 16°C.

3.3.4.2 Deep intrauterine catheterization

Insemination was carried out 36-40 h after hCG administration. Two catheters were used; one of them was a conventional catheter of cervical insemination which serves as a guide for the other one: a flexible catheter 1.80 m long, with 4 mm of external diameter, and 1.8 mm of internal diameter (*Fireflex*[®], Magapor S.L., Zaragoza, Spain).

3.3.5 SURGICAL INTERVENTIONS FOR INTRAUTERINE INSEMINATION, EMBRYO TRANSFER AND COLLECTION

3.3.5.1 Anesthesia and analgesia

Pre-operative anaesthetic and analgesic induction of animals was carried out by a combination of Ketamine (100 mg/ml) 10 mg/Kg (*Imalgene*[®] 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) + Medetomidine (1.0 mg) 0.2 mg/ml (*Domtor*[®], Pfizer S.A., Madrid, Spain) + Midazolam (5 mg/5ml) 0.2 mg/Kg (*Dormicum*[®], Roche, Madrid, Spain) + Morphine Hydrochloride (20 mg/ml) 0.2 mg/Kg (Morphine Braun 2%, B. Braun Medical S.A., Barcelona, Spain) administered intramuscularly until reaching an anaesthetic level in which to allow connection of the animal to the anaesthetic machine by an inhalator mask, supporting anaesthetic level with isofluorane (*Isoflo*[®], Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, Spain) vaporized in oxygen at 2-3%.

For post-operative analgesia, morphine 0.2 mg/Kg was administered intramuscularly every 4 h until 8-12 h after post-operative, continuing analgesia with buprenorphine (0.3 mg/ml) 0.01 mg/kg intramuscularly (*Buprex*[®], Schering-Plough S.A., Madrid, Spain) every 8 h for 3-4 days.

3.3.5.2 Surgical intrauterine insemination

3.3.5.2.1 Spermatozoa preparation and transport of seminal samples

Spermatozoa preparation was similar to that carried out for deep intrauterine insemination, but with a lower insemination dose: 1.5×10^8 spermatozoa/75 μ l DNA (DNA stock solution 200 ng/ μ l), in a final volume of 1.5 ml (Fantinati *et al.* 2005) for each uterine horn. Samples were incubated for 2 h at 16°C.

3.3.5.2.2 Intrauterine insemination

Once the opening in abdominal cavity is made, we observed ovaries in detail, to assure that gilts had completed ovulation process and make count of the total number of hemorrhagic corporuses present in them. Next, we found the oviductal lumen, where we carried out insemination by incision, using a blunt needle to access to oviductal cavity; then, syringe was placed and spermatozoa (heated to 37°C) were deposited in the interior of the lumen of the oviduct.

3.3.5.2.3 Embryo collection

We collected embryos 6-7 days after surgical insemination. We carried out an ovarian-hysterectomy and reproductive tract. Once in the laboratory, we carried out two washings with 20 ml of *Flushing* medium (PBS supplemented with 1 mg/ml of polyvinilic alcohol and preheated at 37°C) of each horn in oviduct-uterus direction. At the same time, we counted corpus luteum in each ovary to thus obtain the ratio of collection of embryos/corpus luteum.

3.3.5.3 Embryo transfer

3.3.5.3.1 Zygote preparation and transport

Once oocytes were injected with semen incubated with RecA:DNA (*section 3.2.3*), they were visualized by a stereomicroscopy for their localization and deposited in *Petri* plates of 500 µl for transport. Embryo transport was carried out in a portable heater at 38°C. Once in lab, they were introduced by inhalation using a pipetting system (*Micro-Classic*[®], Brand, Germany) connected to a catheter *Tom Cat* (Kendall Co., Mansfield, MA, USA) with softened PBS solution at 38°C.

3.3.5.3.2 Embryo transfer

We localized the opening of the infundibulum of the uterine tube in the interior of the ovarian bursa and we quickly introduced the catheter with zygotes. Once they were in the first 4-5 cm of the inner space of the oviduct, the end of the catheter was subject softly with the fingers like a ring. With the help of a 1 ml syringe connected to the catheter, we impelled catheter's content through oviduct. The catheter was later observed under stereomicroscope in order to check that all embryos were transferred into the oviducts.

3.3.6 GESTATION, LABOUR AND PIGLET HANDLING

The sows and gilts were kept under the usual farm conditions and 25 to 28 days after transfer pregnancy diagnosis was carried out by ultrasonography.

A week before expected labour date sows and gilts were transported to a

farrowing room. After birth, we cut and disinfected (*Betadine*[®], Lab Sarget) umbilical cord and injected an iron solution 1-1.5 ml (*Ferroval*[®], Lab Medvet) to avoid iron-deficiency anaemia.

3.3.7 BIOPSY AND TISSUE SAMPLING IN THE PIGLETS

Different techniques were used to obtain tissue samples in the piglets:

3.3.7.1 Laparotomy

After the anaesthetic procedure with isofluorane (*Isoflo*[®], Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, Spain) vaporized in oxygen at 2-3%, the animals were immobilized on the surgical table in supine position. Laparotomy of piglets was made in the same way that was described previously in sows and gilts (*section 3.3.5.2*). Once the abdominal cavity was opened, the liver was localised and a limited among of liver tissue was excised.

After the surgery, post-operative analgesia with buprenorphine (0.3 mg/ml) 0.01 mg/kg intramuscularly (*Buprex*[®], Schering-Plough S.A., Madrid, Spain) every 8 h for 3-4 days and covertures' antibiotic treatment was applied.

3.3.7.2 Endoscopic biopsy needle

For sampling tissue from digestive and respiratory tract endoscopic biopsy leedle were used (120 cm length, 2.2 mm diameter) in the anaesthetised animals.

3.3.7.3 Biopsy needle

Samples from muscle were recovered using biopsy needle (14 G y 20 mm length, Vet-Core Biopsy Needle, Michigan, USA).

3.3.7.4 Other samples

Blood samples were obtained by venepuncture from the medial caudal vein of the piglets. Little samples from tail and ear were recovered by excision using scissors.

3.3.8 EVALUATION OF INTEGRATION OF DNA AND EXPRESSION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (EGFP)

3.3.8.1 DNA integration

Direct evidence of gene integration was carried out by the extraction of genomic DNA from different tissue obtained from piglets, for posterior analysis by PCR. Once DNA was purified, we quantified its concentration in a spectrophotometer. 50-100 ng of purified DNA was used for the PCR of EGFP. Used primers were GFP-1 (5'-TGA ACC CGA TCG AGC TGA AGG G-3') and GFP-2 (5'-TCC AGC AGG ACC ATG TGA TCG C-3'), which specifically amplify a section of 340 base pairs of the DNA of EGFP. Amplification was carried out in a total volume of 25 µl, using 1U of *Taq polymerase* (Promega®), 2.5 µl of 10X buffer, 100 µM dNTP, 0.10 M of each primer and 1.5 mM MgCl₂. PCR cycles consist of a first denaturing cycle at 92°C (2 min), followed by 30 cycles at 92°C (30 sec), 59°C (30 sec), and 72°C (30 sec). Besides, a final cycle of 5 min of extension. PCR product is dissolved in an agarose gel at 1.5% in TBE buffer; subsequently, gel is stained by ethidium bromide and the presence of the gene is then visualized under UV light. Positive (DNA of transgenic mice for EGFP) and negative (DNA of control pig) controls were used in each PCR. Furthermore, each sample was amplified with primers for ZFX/ZFY to confirm their quality (Gutiérrez-Adán *et al.* 1996).

3.3.8.2 EGFP expression

(1) Direct observation

We used direct visualization through blue light with a maximum excitation of 488 nm by an inverted fluorescence microscope (for the case of embryos and follicles of piglets) and a lamp which emits UV light (for the case of piglets).

(2) Western Blot analysis

The steps are in detail described:

(a) Tissue sample homogenization

The tissue samples were homogenized using the system *Kinemática Polytron*[®] PT 10/35 (Kinematica AG, Switzerland) in an ice bath, to avoid heating of the sample by friction. 50 µg of the homogenized tissue was added to 500 µl of a protease inhibitor solution (Complete, EDTA-free, *Roche*[®]). The solution was centrifuged and 20 µl of the supernatant was recovered and added to 5 µl of a buffer under reducing conditions [5% β-mercaptoetanol (vol/vol)] (*Table 6*).

TABLE 6. Buffer under reducing conditions [5% β-mercaptoetanol (vol/vol)].

Component	Concentration
Glycerol	5 ml
SDS	0.1 gr
Tris 1.5 M	1 ml
DDT	500 µl
5% β-mercaptoetanol	200 µg
distilled H ₂ O	hasta 10 ml

pH 6.8

(b) Protein determination

In order to determine the total quantity of proteins, BCA (bicinchoninic acid) Protein Assays was used with BSA like protein control (Smith *et al.* 1985). Protein concentration was expressed in µg/µl.

(c) SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (*Table 7 and 8*). In order to make a discontinuous electrophoresis, as it is our

case, the bucket was filled until a height of about 6 cm, and thus the contact with the oxygen is avoided.

TABLE 7. Resolving gel 10% (10 ml).

Component	Concentration
H ₂ O distilled	4 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH: 8.8	2.5 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
Acrilamida-bis-Acrlamida 30%	3.3 ml
Ammonium persulfate 10%	50 µl
TEMED	10 µl

TABLE 8. Stacking Gels 10% (10 ml).

Component	Concentration
H ₂ O distilled	6.1 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH: 8.8	2.5 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
Acrilamida-bis-Acrlamida 30%	1.3 ml
Ammonium persulfate 10%	50 µl
TEMED	10 µl

The denatured proteins (95°C for 5 min) were subsequently applied to one end of a layer of polyacrylamide gel submerged in a suitable buffer (*Table 9*). An electric current (175 V 36 mA for 1 h) is applied across the gel, causing the negatively-charged proteins to migrate across the gel towards the anode. Protein ZP3-GFP was used as marker (~82.2 KDa).

TABLE 9. Electrophoresis buffer 10X.

Component	Concentration (gr)
Tris 0.025 M	30
glycine 0.192 M	144
SDS 0.1%	10
H ₂ O distilled	hasta 1000 ml

pH 8.3

(d) **Western Blot**

In order to make the proteins accessible to antibody detection, they are moved from within the gel onto a membrane made of nitrocellulose. The entire stack is placed in a transfer buffer solution (*Table 10*) and uses an electric current (100 V 26 mA 1 h) to pull proteins from the gel into nitrocellulose membrane.

TABLE 10. Transfer buffer.

Component	Concentration (gr)
Glycina 39mM	2.9
Tris-base 49mM	5.8
SDS 0.037%	0.37
Methanol 20%	200 ml
H ₂ O distilled	Up to 1000 ml

pH 8.3

Since the membrane has been chosen for its ability to bind protein, steps must be taken to prevent interactions between the membrane and the antibody used for detection of the target protein. Blocking of non-specific binding is achieved by placing the membrane in buffer TBS-T 1X (TBS Tween, *Table 11*), and a protein solution (0.1% BSA in TBS 1X) for 12 h.

After blocking, a dilute solution of primary antibody anti-GFP [Rabbit Polyclonal anti-GFP diluted 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK)] was incubated with the membrane under gentle agitation for 1 h. After rinsing the membrane to remove unbound primary antibody, the membrane was exposed to secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) for another 1 h at room temperature.

TABLE 11. Buffer TBS-T 10X (*Western Blot*).

Component	Concentration (gr)
NaCl 1.5 M	87.7
Tris 0.5 M (pH = 7.5)	60.5
Tween 20 (1%)	10
H₂O distilled	Up to 1000 ml

(e) **Detection**

The membrane of nitrocellulose was placed during 5 min in solution *ECL plus* [ECL Plus Western Blotting Detection System, (GE healthcare, UK)]. Later images from the gel were scanned by a *Typhoon 9410* imager (Amersham Pharmacia Inc. Biotechnology, Bioscience, Friburgo, Germany).

3.3.9 EUTHANASIA OF ANIMALS

Both females and born suckling-pigs used for each experience were sacrificed in humanitarian way by intravenous administration of sodium pentobarbital (*Dolethal*[®], Vetoquinol, Madrid, Spain). Anyway, it was done following the guidelines of the legislation now in force.

3.4 EXPERIMENTAL DESIGN

A series of experiments grouped in 3 sets was designed to evaluate the diverse factors that take part or affect to the process of DNA binding and the efficiency of transgenic generation.

EXPERIENCE 1. EVALUATION OF THE PIG SPERMATOZOA-EXOGENOUS DNA BINDING CAPACITY

In this experience factors affecting spermatozoa DNA-binding capacity and viability were evaluated. The interaction between transgene and spermatozoa was also determined.

Experience 1.1 Effect of the presence or absence of the seminal plasma in the spermatozoa-exogenous DNA binding capacity

(1) Evaluation of the DNA binding capacity in ejaculated spermatozoa

The use of DNA marked with a fluorochrome lead us to evaluate the DNA-binding capacity using a fluorescent microscopy. In this experiment ejaculated spermatozoa from 4 boars were processed in 3 different ways:

- **Group A:** with 0% seminal plasma.
- **Group B:** ejaculated semen diluted 1:10 in SFM (10% seminal plasma).
- **Group C:** ejaculated semen diluted 1:1 in SFM (50% seminal plasma).

Sperm were incubated with DNA (EGFP) marked with Rhodamine (*pGeneGrip-Rhodamine/EGFP*, Gene Therapy System) (1×10^8 spermatozoa/ml + 5 μ g DNA/ml) for 2 h at 16°C. After the incubation time, the samples were fixed by adding 20 μ l formulated saline solution. Two hundred cells were evaluated and classified in DNA bound or not bound. The results represent pooled data from 3 replicates per boar.

The sperm functionality was assayed by microscopic evaluation of the motility, progressive motility and viability by DCF-PI staining after 0, 1 and 2 h after the beginning of the incubation.

(2) Evaluation of binding spermatozoa-exogenous DNA in epididymal spermatozoa

Epididymal and ejaculated spermatozoa were incubated with the DNA marked with fluorescein and in presence of Propidium Iodide in order to evaluate by flow cytometry for DNA binding capacity and viability. For every sample, 10000 cells were evaluated during the incubation time (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min). Each sample evaluation was repeated 3 times.

Experience 1.2 Evaluation of kinetic of binding between the spermatozoa and DNA

Ejaculated spermatozoa were incubated with the DNA marked with fluorescein and in presence of Propidium Iodide for evaluating the spermatozoa DNA binding capacity and viability by flow cytometry. For every sample 3 times 10000 cells were evaluated during the incubation time (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min). In this experiment 6 boars were evaluated and the results are the pool data from 7 replicates per boar. The DNA binding was evaluated after 24 h of co-culture by microscopy observation and flow cytometry.

Experience 1.3 Effect of culture medium on the spermatozoa binding to the exogenous DNA: TALP vs. SFM vs. SFM-SP

Ejaculated spermatozoa were incubated with DNA in two different culture media TALP and SFM, and a third group were incubated in SFM with seminal plasma (160 μ l SP/ml SFM). Spermatozoa DNA binding capacity and viability were evaluated by flow cytometry. Sperm membrane lipid disorder and viability were also measured by staining with Merocianine 540 and Yo-Pro 1

Experience 1.4 Effect of the sperm treatment in the interaction DNA-spermatozoa

The ejaculated spermatozoa were treated by physical methods (frozen-thawed and quick freezing), chemical methods (Triton X-100, DMSO 0.3 and 3%) and incubated with DNA marked with fluorescein or incubated with RecA:DNA complexes. Spermatozoa DNA binding capacity and viability were evaluated by flow cytometry.

Experience 1.5 Effect of the DNA size on the capacity of binding to spermatozoa

Ejaculated spermatozoa were incubated with 5.7 Kbp or 10.3 Kbp DNA. Spermatozoa DNA binding capacity and viability were evaluated by flow cytometry. The results were the pooled data from 5 replicates

Experience 1.6 Location of the interaction between DNA and spermatozoa

Fresh, frozen-thawed and quick frozen spermatozoa were incubated with DNA marked by digoxigenin (DIG). Samples were processed with antibodies anti-DIG labelled by peroxidase (HRP) or FITC. The localization of the DNA was observed by microscopy and epifluorescent microscopy in 400 cells per sample. Also samples were marked with colloidal gold and evaluated by transmission electron microscopy.

EXPERIENCE 2. EVALUATION OF IN VITRO PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS**Experience 2.1 Evaluation of in vitro production of transgenic embryos by ICSI**

Spermatozoa (after different treatments freezing-thawing, quick freezing, Triton X-100) were incubated with DNA at 16°C (1×10^8 spermatozoa/ml + 5 µg DNA (EGFP)/ml) in SFM medium. After at least 30 min, the spermatozoa were injected into the *in vitro* matured oocytes. The first 20-22 h after injection the presumptive zygotes were cultured in TALP medium and later were transferred to NCSU-23 medium.

After 48 h post-injection the cleavage rate were evaluated as the number of 2-4 cells embryos from the total of embryos cultured. After 7 days post-injection the blastocyst formation rate and the mean number of cells per blastocyst were recorded. At day 7 also the rate of transgenic embryos was evaluated.

Experience 2.2 Evaluation of in vitro production of transgenic embryos by IVF

Spermatozoa were incubated with DNA at 16°C (1×10^8 spermatozoa/ml + 5 µg DNA (EGFP)/ml) in SFM medium. After at least 120 min, the spermatozoa were processed for *in vitro* fertilization.

After 48 h post-injection the cleavage rate were evaluated as the number of 2-4 cells embryos from the total of embryos cultured. After 7 days post-injection the blastocyst formation rate and the mean number of cells per blastocyst were recorded. At day 7 also the rate of transgenic embryos was evaluated.

EXPERIENCE 3. EVALUATION OF IN VIVO PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS AND PIGLETS**Experience 3.1 Evaluation of in vivo production of transgenic piglets by deep intrauterine artificial insemination**

Fresh spermatozoa were incubated with DNA at 16°C for 2 h. Insemination was carried out 36-40 h after hCG administration in 4 multiparous sows using a deep intrauterine catheter (100×10^6 spermatozoa in 10 ml/dose; 2 artificial insemination).

After 21-25 days pregnancy was diagnosed by ultrasonography and finally the piglets born was evaluated for transgene integration (PCR) and EGFP expression by direct observation under UV lamp.

Experience 3.2 Evaluation of in vivo production of transgenic embryos by deep laparotomy intrauterine artificial insemination

Fresh spermatozoa were incubated with DNA at 16°C for 2 h. Insemination was carried out in 4 gilts by laparotomy [1.5×10^8 spermatozoa/75 µl DNA (DNA stock solution 200ng/µl), in a final volume of 1.5 ml]. The embryos/blastocyst were recovered after 6-7 days post-insemination and evaluated for expressing EGFP protein.

Experience 3.3 Evaluation of transgenic piglets by embryo transfer

Four gilts received for embryo transfer of presumptive zygotes obtained by injection of *in vitro* matured oocytes with spermatozoa incubated with RecA:DNA complexes. After 21-25 days pregnancy was diagnosed by ultrasonography and finally the piglets born was evaluated for transgene integration (PCR) and EGFP expression by direct observation under UV lamp and *Western Blot*.

3.5 STATISTICAL ANALYSIS

The data were expressed as mean \pm SEM. For the variables studied an ANOVA analysis was applied. The percentages were transformed according a binomial model for categorical variables. When ANOVA reveals a significant effect ($p < 0.05$) *Tukey* test was applied. Software *Systat v11* (Systat Software Inc., 2004. Richmond, CA 94804. USA) was used for the statistical analysis.

RESULTS

The results obtained in each one of the experiences of the present experimental work are next.

4.1 EVALUATION OF THE PIG SPERMATOZOA-EXOGENOUS DNA BINDING CAPACITY

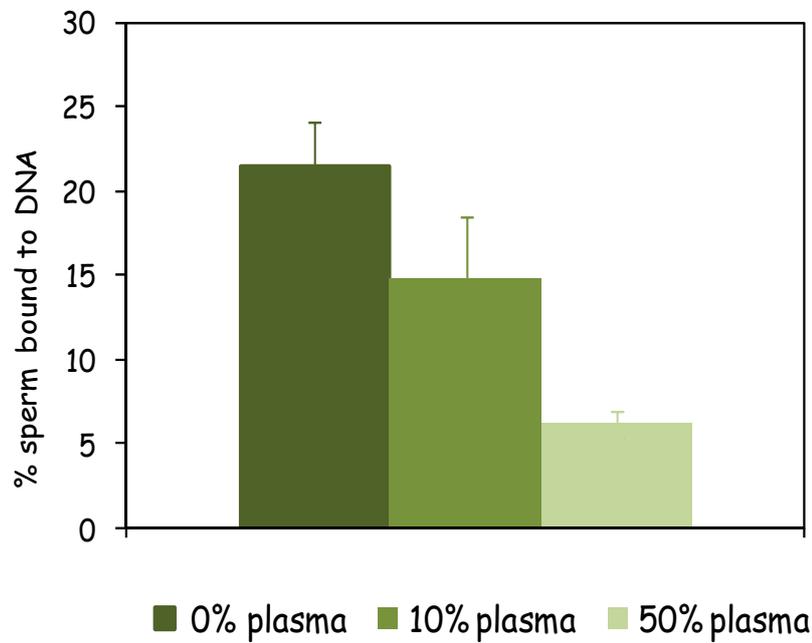
4.1.1 Effect of the presence or absence of the seminal plasma in the spermatozoa-exogenous DNA binding capacity

4.1.1.1 Evaluation of DNA binding capacity in ejaculated spermatozoa

The degree of binding of the spermatozoa to the DNA was evaluated in three experimental groups in the presence of 50%, 10% and 0% of seminal plasma.

The results show that the presence of the seminal plasma influenced in the percentage of bound spermatozoa ($p < 0.01$). Increasing concentration of seminal plasma (0, 10 and 50%) showed a decrease in percentage of sperm bound to DNA from: 21.35 ± 3.43 to 14.78 ± 4.49 to $6.13 \pm 0.89\%$. These results are reflected in *figure 1 and table 12*.

FIGURE 1. Percentage of spermatozoa bound to DNA using 3 different sperm treatments: incubation in the presence of 0%, 10% and 50% of seminal plasma, measured by fluorescence microscopy.



Similarly, there was a significant difference in the degree of binding to the DNA according to the boar used ($p < 0.01$). The observed effect is shown in *figure 2 and table 12*, where male 257 present a greater percentage of binding of spermatozoa than the shown by the other three males. However, the interaction between boar effect and the presence of the seminal plasma in incubation was not significant ($p = 0.16$), this indicates that the behaviour of spermatozoa from each boar was similar when exposed to different treatments, as can be observed in *table 12*.

FIGURE 2. Average percentage of spermatozoa bound to DNA from 4 different boars measured by fluorescence microscope.

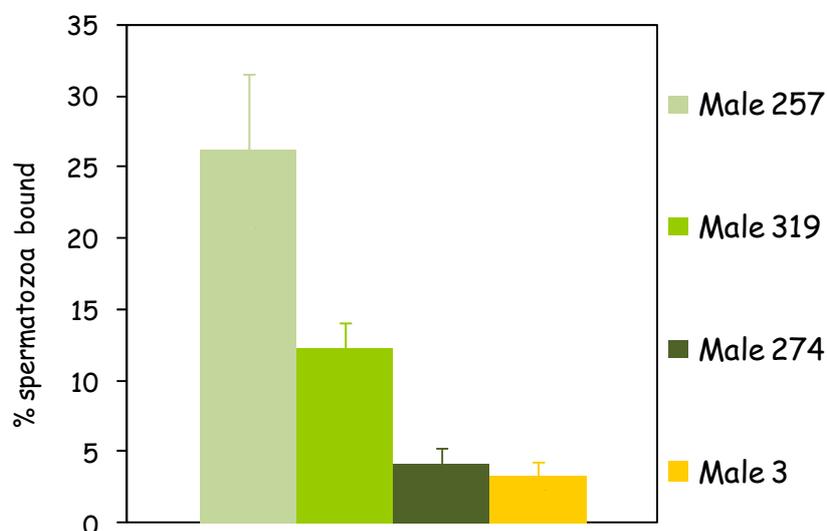


TABLE 12. Percentage of spermatozoa (from 4 different boars) bound to DNA using 3 different sperm treatments: incubation in the presence of 0%, 10% and 50% of seminal plasma.

Boar	0% plasma	10% plasma	50% plasma	Mean value
3	5.83±2.44	2.00±0.82	2.17±1.08	3.33±0.97 ^a
257	39.00±9.65	32.91±11.06	8.50±1.28	26.17±5.41 ^b
274	8.00±2.33	2.43±0.61	2.29±1.11	4.24±1.03 ^a
319	22.17±2.42	8.20±2.98	5.83±1.70	12.29±1.84 ^a
Mean value	21.35±3.43 ^a	14.78±4.49 ^{ab}	6.13±0.89 ^b	

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 12

Source of variance	P values
% seminal plasma	0.01
Boar	<0.01
Interaction seminal plasma and boar	0.16

When studying the effect of the presence of the DNA during the 2 h coculture on the spermatozoa seminal quality, we found that the presence of the DNA did not affect any of the studied sperm parameters (motility, quality of movement and viability) (Table 13).

These parameters of spermatozoa seminal quality decreased throughout the period of incubation. Significant differences were found between the values measured at 0 and 2 h of incubation ($p < 0.01$). The presence of the seminal plasma did not influence in the parameters of seminal quality (Table 13). Finally, we must emphasize that there was a significant effect of the boar used on the parameters of evaluated motility and viability was detected ($p < 0.01$).

TABLE 13. Seminal parameters (motility, progressive motility and viability) of spermatozoa under 3 different sperm treatments: incubation in the presence of 0%, 10% and 50% of seminal plasma in presence or absence of exogenous DNA. Values after 2 h of incubation.

Treatment	DNA presence	Motility	Progressive motility	Viability (DCF/IP)
0% Plasma	+	72.27±1.35	2.50±0.09	81.32±0.85
0% Plasma	-	70.00±2.59	2.41±0.09	80.61±0.91
10% Plasma	+	69.55±1.77	2.32±0.10	77.30±0.93
10% Plasma	-	71.36±1.68	2.39±0.08	78.16±1.26
50% Plasma	+	73.26±1.46	2.48±0.07	83.58±0.95
50% Plasma	-	72.39±1.54	2.43±0.08	84.31±1.04

Anova Table 13

Source of variance	Motility	Progressive motility	Viability (DCF/IP)
DNA presence	0.93	0.43	0.39
% seminal plasma	0.58	1.00	0.24
Interaction plasma and DNA presence	0.73	0.53	0.26

When making an analysis of linear correlation between the seminal parameters and the degree of DNA binding, there is no significant association between the seminal quality of the samples and the capacity to bind to the DNA.

4.1.1.2 Evaluation of DNA binding capacity in epididymal spermatozoa

As the results show in *table 14*, the epididymal spermatozoa present a similar ability to the ejaculated ones in the degree of binding to the DNA like in the viability throughout the incubation. We only detected a greater percentage of binding of the DNA to the live cells.

TABLE 14. Mean values for DNA binding and viability of epididymal and ejaculated spermatozoa cultured for 120 min.

Spermatozoa	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Epididymal	14.64±0.94	12.63±1.23	10.53±1.01	2.10±0.33 ^a
Ejaculated	13.42±0.61	10.94±1.05	9.89±0.97	1.05±0.14 ^b

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 14

Source of variance	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Spermatozoa	0.23	0.31	0.98	<0.01
Incubation time	0.02	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction sperm and incubation time	0.81	0.76	0.80	0.07

4.1.2 Evaluation of kinetic of binding between the spermatozoa and DNA

To study the process of binding of the spermatozoa to the exogenous DNA throughout the time, samples were analyzed by flow cytometry. In 6 studied boars, we found that in the first 15 min of incubation maximal binding between

the DNA and the spermatozoa ($13.80 \pm 0.94\%$) was obtained. Past the 15 min a gradual increase of the percentage of bound until the maximum level of binding (16.57 ± 1.16) at 120 min of incubation.

When these same samples were analyzed after 24 h, by flow cytometry and by microscopic observation, there was a significant increase in the percentage of bound to DNA (26.45 ± 1.65 and $32.00 \pm 5.35\%$, respectively) (Table 15). The differences were not statistically significant ($p > 0.05$).

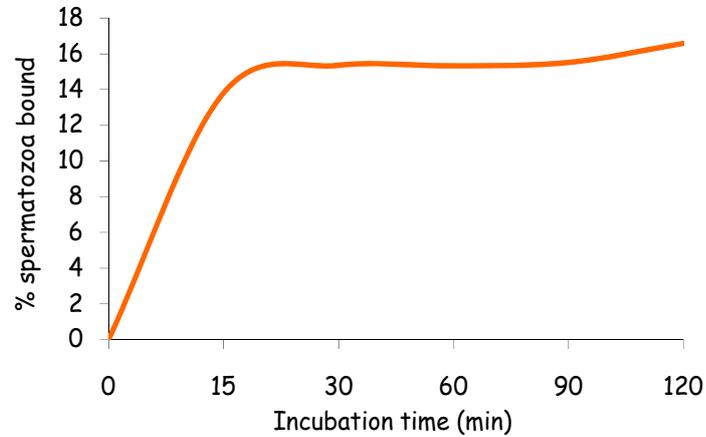
The kinetic of the binding between spermatozoa and DNA are reflected in figures 3 (average data of binding) and 4 (individual behaviour of each one of the studied boar).

TABLE 15. Average percentage of spermatozoa (coming from 6 different males) bound to DNA measured in different times of incubation throughout 24 h by flow cytometry.

Incubation time	% Bound spermatozoa
0 min	0 ^a
15 min	13.80 ± 0.94^b
30 min	15.34 ± 1.01^b
60 min	15.31 ± 0.95^b
90 min	15.50 ± 1.01^b
120 min	16.57 ± 1.16^b
24h	26.45 ± 1.65^c
P < 0.01	

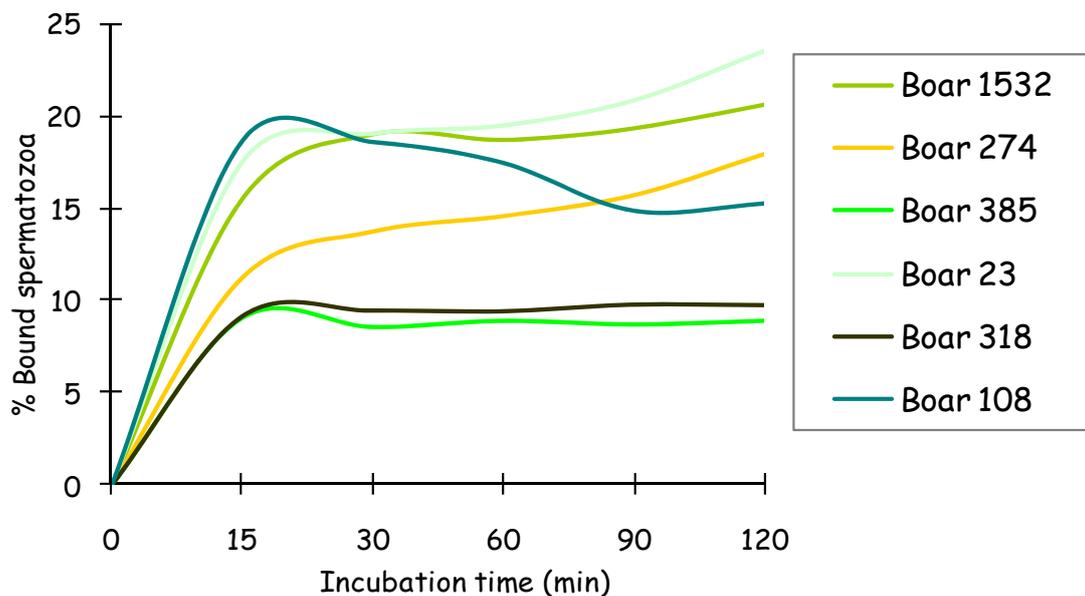
^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

FIGURE 3. Curve of binding of the DNA to the spermatozoa throughout 120 min of incubation measured by flow cytometry (average data of binding).



The effect of the time of incubation and boar (6 different boars) on the exogenous DNA binding was analyzed. We observed that significant differences exist depending on the boar used ($p < 0.01$), and changes in the kinetics of binding throughout the time were present for the different boars (interaction male and time, $p < 0.01$).

FIGURE 4. Kinetic of binding between spermatozoon and DNA throughout 120 min of incubation in the 6 boars used for this experience.



4.1.3 Effect of culture medium on the spermatozoa binding to the exogenous DNA: TALP vs. SFM vs. SFM-PS

When the spermatozoa were incubated in TALP medium, which induces capacitation, the degree of binding to the DNA was much greater than when the spermatozoa was incubated in SFM medium (mean values 44.42 vs. 14.12%, $p < 0.01$). Whereas such spermatozoa that were processed after being in contact with seminal plasma during at least 4 h (SFM-PS) presented a lower level of binding degree that SFM group (11.50 vs. 14.12%, $p < 0.01$). The results are shown in *table 16*.

The increased binding of the spermatozoa incubated in TALP was associated with a greater percentage of cellular death, determined by IP staining (percentage of dead cells in TALP medium greater than in SFM medium). Although the percentage of viable cells together with DNA were in general, very reduced (<2%), in TALP the reduction was higher than in SFM group (*Table 16*). In *figure 5* the values and kinetic of DNA binding to the spermatozoa are showed.

TABLE 16. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa to incubate in different culture medium: SFM, SFM-PS and TALP.

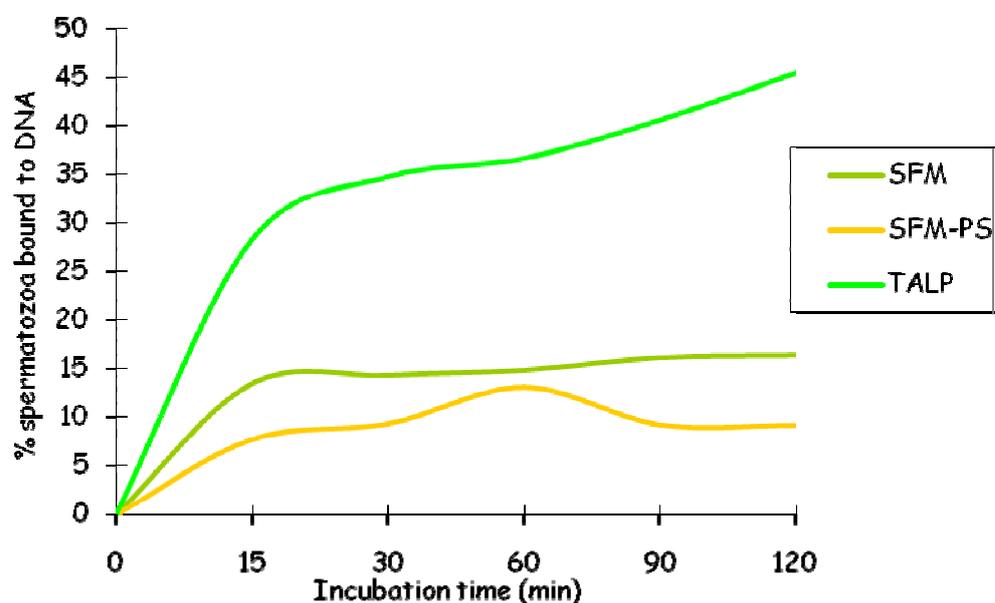
Culture medium	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
SFM	12.88±0.43 ^a	14.12±0.85 ^a	13.57±1.09 ^a	1.01±0.07 ^a
SFM-PS	12.95±0.43 ^a	11.50±0.32 ^b	10.15±0.27 ^a	1.35±0.12 ^{ab}
TALP	45.58±2.43 ^b	44.42±2.51 ^c	42.55±2.40 ^b	1.87±0.16 ^b

^{a, b, c} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 16

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Culture medium	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Incubation time	0.17	<0.01	<0.01	0.47
Interaction medium and time	0.16	0.03	0.01	0.62

FIGURE 5. Kinetic of binding of the spermatozoa to DNA incubated in different culture medium: SFM, SFM-PS and TALP.



In order to verify if a relationship existed between the degree of sperm capacitation and the capacity to transport DNA, we evaluated the membrane lipid disorder and the sperm viability of the spermatozoa incubated in SFM and TALP. When analyzing the data we observed that spermatozoa incubated in TALP medium underwent a significant increase of membrane lipid disorder (TALP: 21.81 ± 1.22 vs. SFM: 3.00 ± 0.25 , $p < 0.01$) and the number of dead spermatozoa was greater than in group SFM (Table 17).

TABLE 17. Mean value of membrane lipid disorder and viability of the spermatozoa incubated in TALP and SFM throughout 120 min.

Culture medium	Low lipid disorder and viable cells	High lipid disorder and viable cells	Dead cells
SFM	79.24 ± 0.65^a	3.00 ± 0.25^a	17.75 ± 0.54^a
TALP	20.69 ± 1.67^b	21.81 ± 1.22^b	57.50 ± 2.09^b

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 17

Source of variation	Low lipid disorder and viable cells	High lipid disorder and viable cells	Dead cells
Culture medium	<0.01	<0.01	<0.01
Incubation time	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction medium and time	<0.01	<0.01	<0.01

Pearson 's correlation analysis between the degree of DNA binding and the parameters of membrane lipid disorder and sperm viability (*Table 18*), showed that there was a direct relation between sperm death and the degree of binding, independently of the used technique ($r=0.57$ and $r=0.53$, $p<0.01$), and an inverse relation between the percentage of cells with low lipid disorder and the degree of binding to DNA ($r=-0.46$, $p<0.01$).

TABLE 18. *Pearson* coefficient of correlation between percentage of binding to DNA and the parameters of membrane lipid disorder and sperm viability.

	<i>Pearson</i> coefficient of correlation	Probability
Low lipid disorder and viable cells	-0.46	<0.01
Dead cells measured by Yo-Pro1 staining	0.57	<0.01
Dead cells measured by IP staining	0.53	<0.01

4.1.4 Effect of the sperm treatment in the interaction DNA-spermatozoa

4.1.4.1 Use of frozen-thawed spermatozoa

The frozen-thawed boar spermatozoa showed a lower viability (dead spermatozoa 60.15 vs. 11.68%, $p<0.01$) and a greater capacity of binding to the DNA than fresh spermatozoa (DNA-binding 55.08 vs. 9.67%, $p<0.01$). Also a considerable percentage of live cells bound to DNA were detected (5.80 ± 0.48) when frozen-thawed spermatozoa were used (*Table 19*).

TABLE 19. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa after 120 min of incubation measured by flow cytometry. Fresh and frozen-thawed spermatozoa.

Spermatozoa	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Fresh	11.68±0.36 ^a	9.67±0.62 ^a	8.84±0.57	0.84±0.08 ^a
Frozen-thawed	60.15±1.20 ^b	55.08±1.79 ^b	49.29±1.71	5.80±0.48 ^b

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 19

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Spermatozoa treatment	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Incubation time	0.16	<0.01	<0.01	0.05
Interaction treatment and time	0.79	<0.01	<0.01	0.15

Samples were put under a rapid process of freezing (quick freezing), we observed a drastic decrease in viability. However, binding capacity to exogenous DNA surpassed 90% (95.23 ± 0.75 , $p < 0.01$) (Table 20).

Similarly, we confirmed the results of previous experiments with microscopic evaluation, where the presence of the seminal plasma reduced the binding capacity to the DNA (26.25 ± 0.79 vs. 31.92 ± 1.13 , $p < 0.01$).

TABLE 20. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa after 120 min of incubation measured by flow cytometry. Fresh and quick frozen spermatozoa.

Spermatozoa treatment	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Fresh	31.27±1.09 ^a	31.92±1.13 ^a	30.71±1.11 ^a	1.38±0.06 ^a
Fresh (SP)	24.41±0.74 ^b	26.25±0.79 ^b	23.74±0.77 ^b	2.51±0.11 ^b
Quick freezing	95.23±0.75 ^c	93.76±1.32 ^c	92.44±1.09 ^c	2.33±0.13 ^b

^{a, b, c} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 20

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Spermatozoa treatment	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Incubation time	0.92	0.03	0.01	0.51
Interaction treatment and time	0.96	0.96	0.87	0.95

4.1.4.2 Use of spermatozoa treated with Triton X-100

The treatment with Triton X-100 supposes an immediate alteration of the structure of the membrane associated to a high degree of binding to the DNA (90.50 ± 1.11 , Table 21).

TABLE 21. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa after 120 min of incubation measured by flow cytometry. Fresh and Triton X-100 treated spermatozoa.

Spermatozoa treatment	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Fresh	31.44±1.09 ^a	32.09±1.12 ^a	30.71±1.11 ^a	1.38±0.06
Triton X-100	96.42±0.43 ^b	90.50±1.11 ^b	88.80±1.16 ^b	1.69±0.23

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 21

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Spermatozoa treatment	<0.01	<0.01	<0.01	0.15
Incubation time	0.70	0.82	0.74	0.09
Interaction treatment and time	0.97	0.99	0.97	0.05

4.1.4.3 Use of spermatozoa treated with DMSO

The spermatozoa treated with DMSO (3%) presented a significantly lower viability than control, whereas 0.3% DMSO group stayed in an intermediate position. The capacity to bind to the exogenous DNA was also different.

The viability of spermatozoa in the control group was significantly lower in comparison to 3% DMSO group. In addition, there was a significantly higher level of exogenous DNA bound to the dead spermatozoa in the control group. Conversely, there was a significant increase in viable and DNA bound cells with increasing concentration of DMSO (0% to 0.3% to 3%, respectively) (Table 22).

TABLE 22. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa after 120 min of incubation measured by flow cytometry. Fresh and DMSO treated spermatozoa.

Spermatozoa treatment	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Fresh	34.87±0.97 ^a	35.76±0.98 ^a	34.36±0.97 ^a	1.40±0.06 ^a
DMSO 0.3%	31.95±0.93 ^{ab}	32.97±0.94 ^{ab}	31.35±0.95 ^{ab}	1.62±0.06 ^b
DMSO 3%	31.34±0.98 ^b	31.95±0.97 ^b	30.11±0.97 ^b	1.84±0.07 ^c

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 22

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Spermatozoa treatment	0.02	0.02	0.01	<0.01
Incubation time	0.17	0.23	0.18	0.01
Interaction treatment and time	1.00	1.00	1.00	0.94

4.1.4.4 Use of spermatozoa incubated with RecA:DNA complexes

The incubation of spermatozoa in the presence of recombinase RecA supposed an increase of the percentage of dead cells (26.60 ± 0.46 vs. 22.48 ± 0.63), and at the same time an increase of the percentage of cells bound to DNA (24.69 ± 0.70 vs. 19.68 ± 0.73) with respect to incubated intact spermatozoa solely with gene EGFP. The results are in *table 23*.

TABLE 23. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa after 120 min of incubation measured by flow cytometry. Fresh and RecA treated spermatozoa.

Spermatozoa treatment	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Fresh-DNA	22.48±0.63 ^a	19.68±0.73 ^a	19.21±0.71 ^a	0.47±0.09
RecA-DNA	26.60±0.46 ^b	24.69±0.70 ^b	24.11±0.69 ^b	0.58±0.09

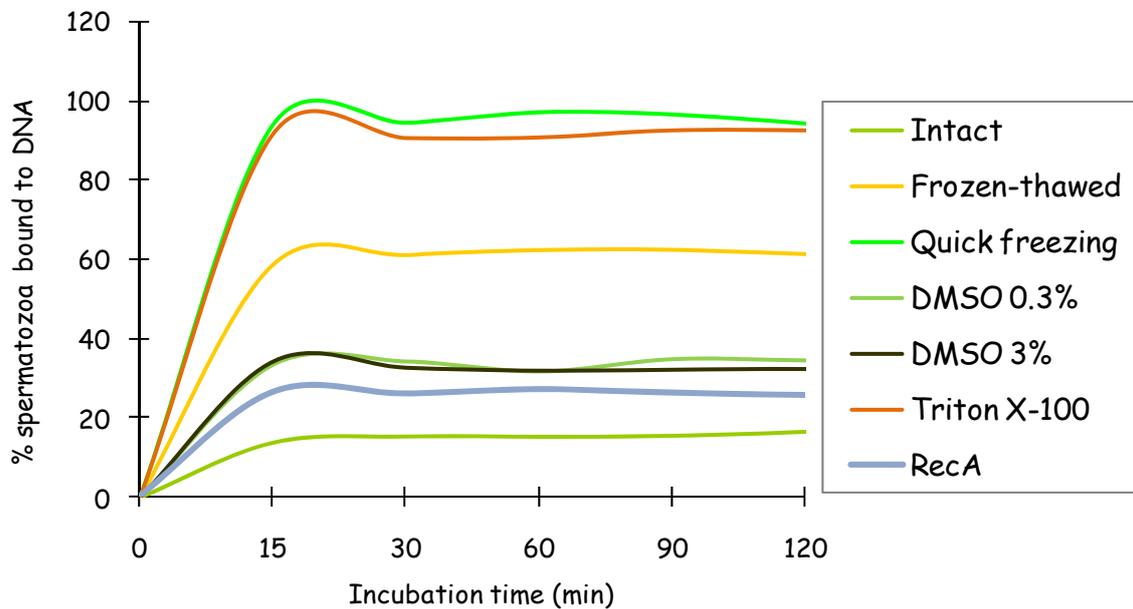
^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 23

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
Spermatozoa treatment	<0.01	<0.01	<0.01	0.40
Incubation time	0.66	<0.01	<0.01	0.21
Interaction treatment and time	0.92	0.92	0.86	0.47

To summarize, in *figure 6* represents the kinetic of binding between the spermatozoa and the DNA in the different experiments carried out (*experiences 4.1.2 and 4.1.4*). In all the cases we observed that the kinetic of binding is similar independent of treatment used during the incubation time. Despite the most binding taking place in the first 15 min of incubation, the rate of binding becomes constant until the 120 min of coculture. The rate of binding was highest when treating the spermatozoa with Triton X-100 and by quick freezing.

FIGURE 6. Kinetic of binding of the spermatozoa to DNA incubated during 120 min. Spermatozoa treated in different ways.



4.1.5 Effect of the DNA size on the capacity of binding to spermatozoa

When evaluating the use of different DNA size (5.7 vs. 10.3 Kbp) the results show no significant effect on the parameters studied (viability and capacity of binding to the DNA) associated to the size of DNA (*See table 24 and figure 7*). Whereas, with progression of incubation time there was no effect of DNA molecular weight on the degree of decrease in sperm viability..

As it was described in the previous section, the time of incubation affects the viability and the DNA-binding capacity ($p < 0.01$, *Table 24*).

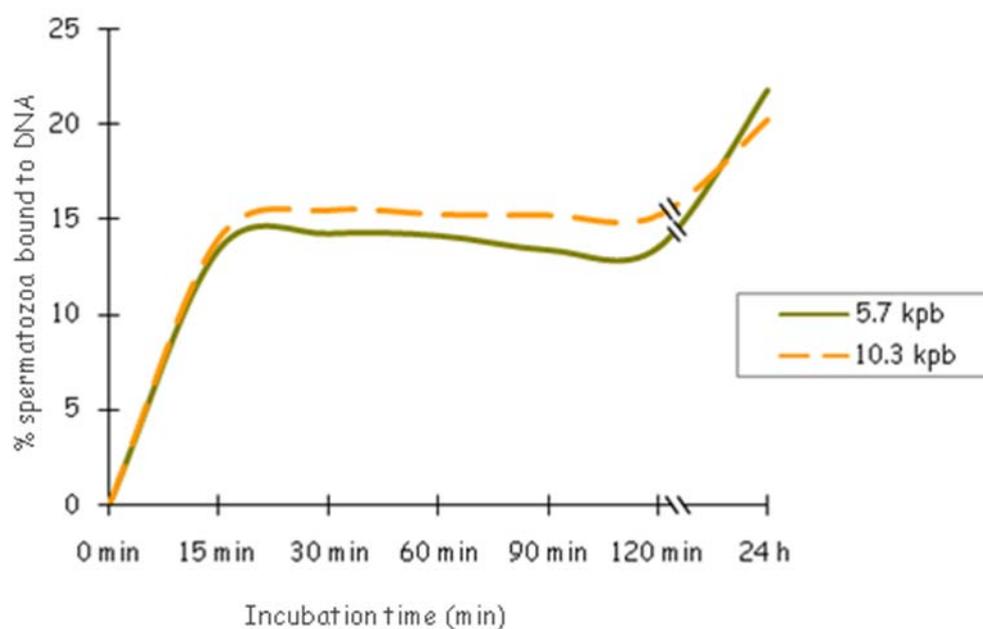
TABLE 24. Mean values for sperm viability and DNA-binding to the spermatozoa after 1440 min of incubation measured by flow cytometry. DNA size 5.7 Kbp and 10.3 Kbp.

DNA size	Time (min)	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
5.7 Kbp	0	11.66±1.02 ^a	-	-	-
5.7 Kbp	15	14.10±0.98 ^a	13.43±0.74 ^a	11.43±0.98 ^a	1.40±0.31
5.7 Kbp	30	14.40±1.17 ^a	14.27±0.88 ^a	12.00±0.89 ^a	1.22±0.21
5.7 Kbp	60	14.22±1.29 ^a	14.16±1.05 ^a	12.09±1.03 ^a	1.41±1.07
5.7 Kbp	90	14.30±1.23 ^a	13.41±1.11 ^a	12.32±0.97 ^a	1.70±0.82
5.7 Kbp	120	13.96±1.27 ^a	13.53±1.26 ^a	11.60±1.14 ^a	1.93±0.57
5.7 Kbp	1440	21.80±2.2 ^b	23.07±2.1 ^b	20.19±2.33 ^b	0.83±0.22
10.3 Kbp	0	10.33±1.29 ^a	-	-	-
10.3 Kbp	15	13.61±1.36 ^{ab}	13.97±0.77 ^a	10.63±0.73 ^a	2.40±0.18
10.3 Kbp	30	14.50±1.43 ^{ab}	15.45±1.08 ^a	11.40±0.80 ^a	2.41±0.60
10.3 Kbp	60	14.45±1.51 ^{ab}	15.23±0.93 ^a	12.38±0.91 ^a	1.25±0.30
10.3 Kbp	90	14.78±1.18 ^{ab}	15.19±0.92 ^a	12.76±0.93 ^a	0.82±0.29
10.3 Kbp	120	15.95±1.37 ^{ab}	15.17±1.05 ^a	12.89±0.91 ^a	1.98±0.66
10.3 Kbp	1440	20.18±2.70 ^b	22.67±2.5 ^b	19.23±2.68 ^b	0.96±0.25

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Anova Table 24

Source of variation	% Dead spermatozoa	% Bound spermatozoa	% Bound and dead cells	% Bound and live cells
DNA size	0.90	0.16	0.94	0.52
Incubation time	<0.01	<0.01	<0.01	0.44
Interaction DNA size and time	0.90	0.95	0.93	0.52

FIGURE 7. Kinetic of binding of the spermatozoa to DNA incubated during 120 min, DNA size 5.7 Kbp and 10.3 Kbp.

4.1.6 Location of the interaction between DNA and spermatozoa

The fresh spermatozoa (intact) were bound in smaller proportion to the DNA than the frozen-thawed spermatozoa and less than the spermatozoa treated by quick freezing (*Table 25*).

The use of the immune-cytological techniques using markers with fluorescein (FITC) and peroxidase (HRP) were valuable tools to measure the spermatozoa-DNA binding capacity. However, there was a tendency ($p=0.08$) to obtain greater values in the percentage of DNA binding when fluorescein was

used and differences in these techniques as far as the effectiveness are detected to locate the DNA binding in the different parts from the sperm head.

When fluorescein (FITC) was used, a greater percentage of cells bound to the DNA on the whole sperm head, including the acrosomal region, were assigned than when peroxidase was used (HRP). However, the use of HRP, detected greater binding to the postacrosomal region (*Table 25*).

TABLE 25. Location of DNA binding to spermatozoa subsequent to different treatments (fresh/intact, frozen-thawed, quick freezing). Evaluation by two staining techniques (FITC and HRP).

Spermatozoa treatment	Staining	Acrosomal region	Post-acrosomal	Whole head	N° bound cells
Fresh	FITC	32.00±5.47	5.23±1.78	26.23±5.21	36.54±5.90
Fresh	HRP	5.38±1.29	30.62±3.84	15.08±4.04	48.92±6.79
Frozen-thawed	FITC	12.21±2.97	20.93±3.44	40.86±2.88	26.00±3.05
Frozen-thawed	HRP	4.93±1.22	43.87±2.64	22.67±3.15	28.67±4.46
Quick freezing	FITC	6.71±1.27	12.64±1.62	68.93±2.36	11.64±2.40
Quick freezing	HRP	2.33±0.71	35.33±6.05	44.67±7.67	17.67±5.74

Anova Table 25

Source of variation	Acrosomal region	Post-acrosomal	Whole head	N° stained cells
Sperm treatment	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Stain	<0.01	<0.01	<0.01	0.08
Interaction	<0.01	0.91	0.34	0.60

We observed that the staining technique affects the binding results, so we analyzed each one of the staining techniques separately. In the following *tables (26 and 27)* the percentage of binding and the proportion in which the DNA binding takes place to different areas of the spermatozoa (acrosomal, post-acrosomal or whole head).

Using **FITC** it was observed that fresh spermatozoa presents the smaller percentage of binding to the DNA, and this binding is mainly localized in the acrosomal region. When we observed frozen-thawed or quick frozen spermatozoa, it increases the proportion of DNA bound spermatozoa, but in addition also changes the DNA binding pattern, since it tends to be bound to the whole sperm head (*Table 26*).

TABLE 26. Location of DNA binding to spermatozoa after different sperm treatments (fresh/intact, frozen-thawed, quick freezing). Evaluation by FITC staining technique.

Sperm treatment	% Bound cells	Acrosomal region	Post-acrosomal	Whole head
Fresh	63.46±5.90 ^a	51.09±7.70 ^a	8.87±3.50 ^a	40.04±5.88 ^a
Frozen-thawed	74.00±3.05 ^{ab}	17.77±4.49 ^b	27.41±4.38 ^b	54.82±2.55 ^b
Quick frozen	88.29±2.38 ^b	7.76±1.58 ^b	14.15±1.68 ^a	78.09±1.75 ^c
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

^{a, b, c} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Using **HRP**, we reached the same conclusions as far as the percentage of cells that are bound to DNA, which increases significantly after the freezing treatment. Nevertheless, the DNA binding pattern observed is different. The binding to the sperm post-acrosomal region predominates. However, in the spermatozoa after a process of quick freezing there is a greater percentage of binding to the acrosome region and to the whole sperm head that in the other two remaining groups (*Table 27*).

We observed that in most of the damaged acrosome spermatozoa (mainly by freezing processes), the staining signal (HRP or FITC) was located specifically in the acrosomal content.

TABLE 27. Location of DNA binding to spermatozoa after different sperm treatments (fresh/intact, frozen-thawed, quick freezing). Evaluation by HRP staining technique.

Sperm treatment	% Bound cells	Acrosomal region	Post-acrosomal	Whole head
Fresh	51.08±6.79 ^a	11.03±3.06 ^a	61.93±5.23	27.03±5.31 ^a
Frozen-thawed	71.47±4.44 ^b	6.85±1.73 ^{ab}	63.04±3.72	30.10±3.17 ^a
Quick frozen	82.33±5.74 ^b	2.94±0.87 ^b	45.16±7.71	51.89±7.24 ^b
P	<0.01	0.04	0.06	<0.01

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

The **electron microscope** detected the presence of gold granules, which corresponds to DNA binding, in diverse regions of the head of the spermatozoa. However, the sperm tail and intermediate piece presented lower number of gold granules.

Signals of DNA binding were higher in the acrosome, in the post-acrosomal region and in the nuclear region next to the equatorial segment of the sperm head in comparison to tail and mid piece. In acrosome, DNA binding was visualized on the apical membrane and to the acrosomal matrix. The images are shown in *figure 36*. The obtained images and the patterns of binding were different according to the sperm treatments:

- The *fresh/intact spermatozoa* showed a greater integrity of the acrosomal structure than spermatozoa treated by freezing processes. The fresh spermatozoa displayed a greater amount of located gold granules in the acrosomal region than in other zones of the sperm head. These data are in agreement with the observed results in the previous assays using fluorescence microscope with FITC.
- In the *frozen spermatozoa* samples (frozen-thawed and quick frozen), acrosome presented an accentuated alteration of their membranes in particularly in the quick frozen group. Also, extensive regions of the plasma membrane were damaged. In relation to the DNA binding, when

we observed a marked increase in acrosomal damage, the binding was detected mainly in the acrosomal content.

4.2 EVALUATION OF *IN VITRO* PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS

4.2.1 Evaluation of *in vitro* production of transgenic embryos by ICSI

4.2.1.1 Evaluation of *in vitro* production of transgenic embryos by ICSI using fresh spermatozoa

In this first study of ICSI a total of 167 matured *in vitro* oocytes were injected. The cleavage rate for the experimental group was of 44% (64/144) and 16 of them reached the blastocyst stage (25%) with an average number of cells per blastocyst of 22.71 ± 3.64 . Of the obtained embryos, 14 (21.8%) of them expressed the fluorescent green protein (from 2 cells embryos to blastocyst state). Some of these transgenic embryos were mosaic and only a few of the blastomeres expressed the protein (EGFP). The incubation of the spermatozoa with the DNA did not affect the embryo output, where there was similar rates of embryonic cleavage and production of blastocysts in both groups ($p > 0.05$) and the same number of cells per blastocyst. The data are reflected in *table 28*.

TABLE 28. *In vitro* embryonic development of oocytes injected with spermatozoa incubated (+DNA) or not (-DNA=control) with DNA and expression of EGFP protein in the embryos.

Sperm treatment	N° oocytes	Cleavage rate (%)	Blastocyst* (%)	N° cells/ blastocyst	% EGFP Expression*
Intact (-DNA)	23	60±10.00	20.00±10.69	22.00±3.00	-
Intact (+DNA)	144	44.44±4.16	25.00±5.46	22.71±3.64	21.87±5.21
P		0.15	0.69	0.93	

*Related to cleaved embryos

4.2.1.2 Evaluation of *in vitro* production of transgenic embryos by ICSI using frozen-thawed and quick frozen spermatozoa

Frozen-thawed spermatozoa produced similar number of embryos to the control group using fresh semen. The rate of transgenic embryos, that expressed partially or totally the fluorescent green protein, obtained in this experience was close to 40%, without differences between the experimental groups (*Table 29*).

TABLE 29. *In vitro* embryonic development of oocytes injected with frozen-thawed or fresh spermatozoa incubated with DNA and expression of EGFP protein in the embryos.

Sperm treatment	N° oocytes	Cleavage rate (%)	Blastocyst* (%)	N° cells/blastocyst	% EGFP Expression*
Fresh	168	50.60±3.87	12.94±3.66	51.10±12.51	37.65±5.29
Frozen-thawed	180	49.44±3.74	11.24±3.37	42.80±9.15	44.94±5.30
P		0.83	0.73	0.60	0.330

*Related to cleaved embryos

On the other hand, the use of quick frozen spermatozoa, that produced an intense alteration of the sperm membrane, significantly increased the percentage of transgenic embryos (84.09 vs. 53.06%, $p < 0.01$). The embryonic production with these spermatozoa tended to be lower than in the control group, although the differences were significant (*Table 30*).

TABLE 30. *In vitro* embryonic development of oocytes injected with quick frozen or fresh spermatozoa incubated with DNA and expression of EGFP protein in the embryos.

Sperm treatment	N° oocytes	Cleavage rate (%)	Blastocyst* (%)	N° cells/blastocyst	% EGFP Expression*
Fresh	105	46.67±4.89	14.29±5.05	36.40±7.08	53.06±7.20 ^a
Quick Frozen	101	38.61±7.87	2.56±2.56	25.00±1.00	84.09±5.58 ^b
P		0.24	0.06	0.38	<0.01

*Related to cleaved embryos

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

4.2.1.3 Evaluation of *in vitro* production of transgenic embryos by ICSI using spermatozoa treated with Triton X-100

The use of spermatozoa treated by Triton X-100 in the ICSI-SMGT system gave rise to a lower rate of embryonic division and similar levels in the rate of blastocyst formation and transgenic embryos than the control group (fresh spermatozoa) (Table 31).

TABLE 31. *In vitro* embryonic development of oocytes injected with Triton X-100 treated or fresh spermatozoa incubated with DNA and expression of EGFP protein in the embryos.

Sperm treatment	N° oocytes	Cleavage rate (%)	Blastocyst* (%)	N° cells/blastocyst	% EGFP Expression*
Fresh	101	53.47±4.99 ^a	3.70±2.59	41.33±12.89	20.37±5.53
Triton X-100	96	32.29±4.80 ^b	0	-	29.03±8.29
P		0.01	0.28		0.37

*Related to cleaved embryos

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

4.2.1.4 *In vitro* production of transgenic embryos by ICSI using spermatozoa treated with RecA recombinase

The use of spermatozoa treated by RecA recombinase did not affect the production of embryos, with similar rates of embryonic cleavage and blastocysts formation in both groups ($p > 0.05$, Table 32). However, the use of this recombinase clearly increased the percentage of transgenic embryo formation, where expression was nearly to 90%. This was higher than 51.56% of transgenic embryos when fresh semen was used. We must in addition emphasize that in 7 of the 9 replicates, the total of the analyzed embryos (100%) expressed the protein.

TABLE 32. *In vitro* embryonic development of oocytes injected with RecA treated or fresh spermatozoa incubated with DNA and expression of EGFP protein in the embryos.

Sperm treatment	N° oocytes	Cleavage rate (%)	Blastocyst* (%)	N° cells/blastocyst	% EGFP Expression*
Fresh	117	54.70±4.62	10.94±3.93	43.33±9.92	51.56±6.30 ^a
RecA	131	50.38±4.39	18.18±4.78	37.58±5.75	87.88±4.05 ^b
P		0.50	0.25	0.60	<0.01

*Related to cleaved embryos

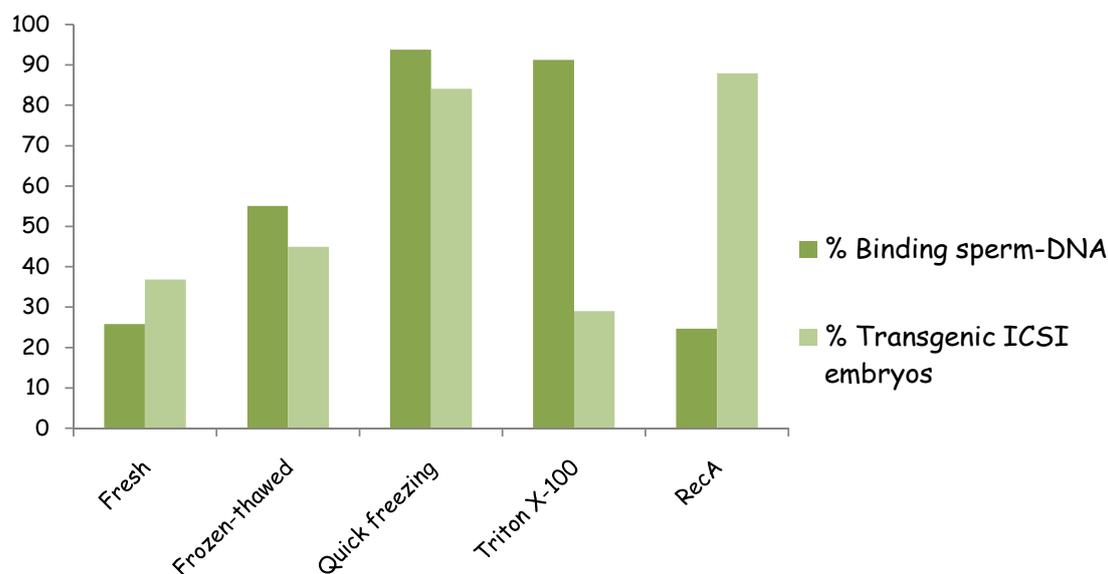
^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

As a summary, the percentage of DNA binding to the spermatozoa and the percentage of transgenic embryos produced by ICSI in the previous experiments with different sperm treatments, is shown in *Figure 8*.

When analyzing the results of the three first experimental groups (intact, freezing-thawing and quick freezing) we observed that there was a direct correlation between the DNA bindings and the percentage of transgenic embryos produced, while in the Triton X-100 and RecA groups showed no relationship. In Triton X-100 group the percentage of binding to the DNA is close to 90%. Nevertheless, in this group the production of transgenic embryos does not exceed 30%. On the contrary, in the RecA group, we observed exactly the inverse relationship, when we measured the binding, by means of flow

cytometry, the percentage value was close to 30% whereas the transgenic embryos obtained by this technique increased to around 90%.

FIGURE 8. DNA binding and transgenic embryo production using spermatozoa treated by different methodologies.



4.2.2 Evaluation of *in vitro* production of transgenic embryos by IVF using fresh and treated spermatozoa with RecA recombinase

The *in vitro* fertilization (IVF) using spermatozoa incubated with the exogenous DNA did not allow transgenic embryos to be obtained that expressed protein EGFP.

The co-incubation of the spermatozoa only with DNA induced a lower rate of embryonic cleavage than when RecA:DNA complex was used (41.26 ± 4.13 vs. 25.13 ± 2.22 , $p < 0.05$). The rates of cleavage for the control group, in which DNA was not used, remained in an intermediate position (38.98 ± 6.40 , Table 33).

On the other hand, the production of blastocysts and the mean number of cells per blastocyst were similar in 3 experimental groups ($p > 0.05$, Table 33).

TABLE 33. *In vitro* embryonic development of oocytes *in vitro* fertilized with RecA treated, fresh spermatozoa incubated with (+DNA) or without DNA (-DNA=control) and expression of EGFP protein in the embryos.

Sperm treatment	N° oocytes	Cleavage rate (%)	Blastocyst* (%)	N° cells/blastocyst	% EGFP Expression*
Intact (-ADN)	59	38.98±6.40 ^{ab}	21.74±8.79	36.40±9.28	-
Intact (+ADN)	382	25.13±2.22 ^a	21.87±4.24	37.26±3.32	0
Intact (+RecA: DNA)	143	41.26±4.13 ^b	15.25±4.72	28.45±3.34	0
P		<0.01	0.59	0.27	

*Related to cleaved embryos

^{a, b} in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

4.3 EVALUATION OF *IN VIVO* PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS AND PIGLETS

4.3.1 Evaluation of *in vivo* production of transgenic piglets by deep intrauterine artificial insemination

Three of the four inseminated sows were diagnosed pregnant by ultrasonographic evaluation at 25-28 post-insemination days (fecundation rate 75%). After 113-117 pregnancy days, sows finished in normal farrowing giving rise to a total of 22 piglets (9 females and 13 males). Sow n° 2 gives 8 piglets, 4 of which were stillborn and one died few hours after the birth. The diagnosis for the 4 born dead piglets was perinatal death by asphyxia. All the other piglets were physiologic and morphologically normal, with mean weight for the piglets of 1143±112 gr (sow n° 2) y 1905±68 gr (sow n° 3).

The tests were developed to analyze integration (PCR) for the expression of EGFP transgene (UV illumination) for each pig. The results were negative in all the cases. The results from this experience are reflected in *table 34*.

TABLE 34. Fertility performance after deep intrauterine insemination with semen incubated with DNA (EGFP).

	Pregnancy	Pregnancy length	Litter size	Female + Male	EGFP Integration	EGFP Expression
Sow 1	+	116	4	2 + 2	0	0
Sow 2	+	113	8	4 + 4	0	0
Sow 3	+	117	10	3 + 7	0	0
Sow 4	-	Return to oestrus after >21 days	-	-	-	-

4.3.2 Evaluation of *in vivo* production of transgenic embryos by deep laparotomy intrauterine artificial insemination

The induction of the ovulation resulted in the development of an average of 10.50 ± 2.90 corpora lutea per gilt. After the surgery a total of 5 embryos were recovered, being all of them normal embryos (blastocysts) and with a high quality (two of them had more than 400 cells) (*Table 35*). When we analyzed the blastocysts recovered after 6-7 days post-insemination, means of the fluorescence microscope, none of them expressed protein EGFP.

TABLE 35. *In vivo* embryo production by deep laparoscopic intrauterine artificial insemination. Recovery of embryos after 6-7 days post-insemination.

	Corpora lutea (per ovary)	Embryos recovered/gilt	Embryos recovered/total CL (%)	Blastocyst (%)	N° cells/blastocyst	EGFP Expression (%)
Sow 5	8(5/3)	0	0(0)	-	-	-
Sow 6	6(6/0)	3	3/6(50)	3(50)	34.67±2.85	0(0)
Sow 7	9(7/2)	2	2/9(22.2)	2(22.2)	>400	0(0)
Sow 8	19(11/8)	0	0(0)	-	-	-
Mean values	(42/4) 10.50±2.90	(5/4) 1.25±0.75	(5/42) 11.90%	(5/5) 100%	180.80±89.50	

4.3.3 Evaluation of transgenic piglets production by embryo transfer

The results of the embryo transfer produced by ICSI-SMGT-RecA are reflected in *tables 36 and 37*. A total of 412 oocytes were injected and surgically transferred to the oviduct of 4 super-ovulated gilts (ranging 95-113 zygotes by receiving gilt). Three of the transferred gilts returned to oestrus 21 days or more after the embryo transfer.

The sow n° 12, transferred with 113 zygotes, was diagnosed pregnant 25 days after the embryo transfer, what supposes a rate of success of 25%. After 113 days of pregnancy the gilt farrowed 8 piglets (5 females and 3 males), three of them were born dead. The pigs born alive did not show anatomical nor physiological alterations and had a normal growth. The average weight of the litter was of 1035±334 gr. The growth of the piglets in the first weeks of life was normal for this type of animals and conditions (*Table 38*).

TABLE 36. Fertility performance after embryo transfer of zygotes produced by ICSI.

	Embryos transferred	Pregnancy	Litter size
Sow 9	102	Return to oestrus after > 21 days	-
Sow 10	102	Return to oestrus after > 21 days	-
Sow11	95	Return to oestrus after > 21 days	-
Sow12	113	+	8
Total	103±3.72	25%	8

TABLE 37. Piglet weight and gender born by embryo transfer.

Piglet	Born	Weight (gr)	Gender
N° 034	Alive	1.500	Female
N° 035	Alive	1.020	Female
N° 036	Alive	1.300	Female
N° 037	Alive	800	Male
N°038	Alive	1.100	Female
N°039	Dead	1.200	Male
N° 040	Dead	960	Male
N°041	Mummificated	400	Female
Total		1.035±334	

TABLE 38. Growth of the piglets in the first weeks of life (weight).

Piglet	At birth (gr)	1 week (gr)	4 weeks (kg)
N° 034	1.500	2.950	>15
N° 035	1.020	2.650	9.75
N° 036	1.300	2.800	11
N° 037	800	1.750	7.5
N° 038	1.100	2.650	11
Total	1.144±267	2.560±469	

The data collected after practicing the autopsy of the three pigs born dead were the following ones:

- **N° 039:** Pulmonary atelectasia, the animal died before getting to breath. Pathological signs of mention were not observed.
- **N° 040:** Several days dead in the interior of the uterus (2-3 days), it displays signs of deathly decomposition.
- **N° 041:** Mummified (death approximated in day 70 of gestation).

Finally, PCR analyses were made to detect the virus DNA presence [Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and porcine circovirus-PCV] and bacteria (Salmonella) in the tissue samples from piglets dead born, to discard the possible cause of the death by viral or bacterial infection. The results that we obtained were negative except by the DNA presence of porcine circovirus in the samples from piglets n° 039 and 040, but analyzing the epidemiological conditions of the case the possible reason of the death does not seem to be this infection.

4.3.3.1 Analysis of the integration of DNA in piglet's tissues

We analyzed the DNA integration by PCR in samples from different tissues. Twelve different tissues from dead born piglets were analyzed. In 2 of the 3 still

born animals were positive (n° 039 and 040) for this test and DNA was integrated in 75% (9/12) of analyzed tissues (*Table 39* and *figures 9* and *10*). In both animals the cardiac tissue was negative, whereas it was positive in samples from liver, kidney, brain, muscle, gonads, stomach and intestine. Finally we detected positive values for samples from the skin, lung, spleen and the pericardic vascular package from only one animal.

TABLE 39. Analysis of the integration of DNA from piglets' tissues samples by PCR. Samples from 3 dead born piglets. Levels of integration (-) no signal, (+++) high signal, (++) medium signal, (+) low signal.

	Tissues	Piglet n° 039	Piglet n° 040	Piglet n° 041
1	Liver (LI)	+	+	-
2	Kidney (KI)	++	+++	-
3	Brain (BR)	+	+	-
4	Skin (SK)	-	+	-
5	Muscle (MU)	+	+	-
6	Lung (LU)	+	-	-
7	Hearth (HE)	-	-	-
8	Testicle (TE)/ovary(OV)	+	+	-
9	Spleen (SP)	+	-	-
10	Stomach (ST)	++	+	-
11	Intestine (IN)	++	+	-
12	Blood vessels (BV)	-	+	-

FIGURE 9. Analysis of the integration of DNA from piglets' tissues samples by PCR. Piglet n° 039. In green positive signal.

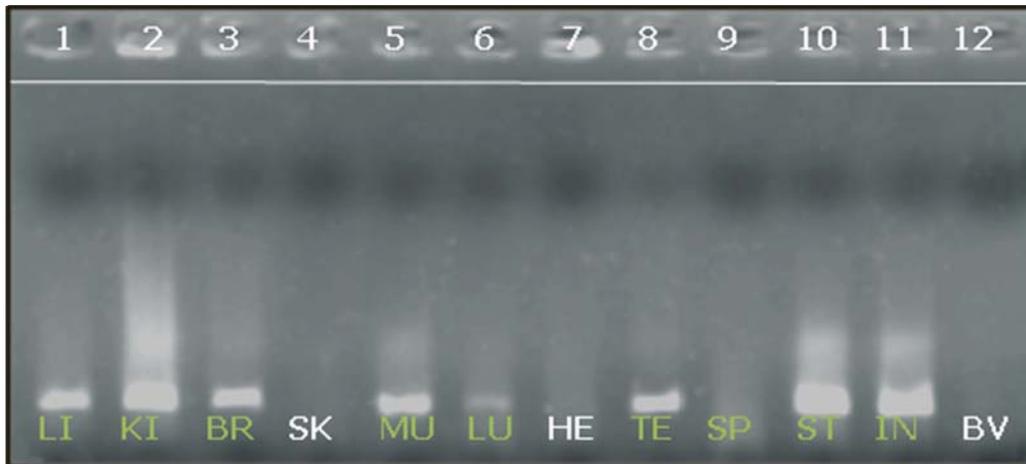
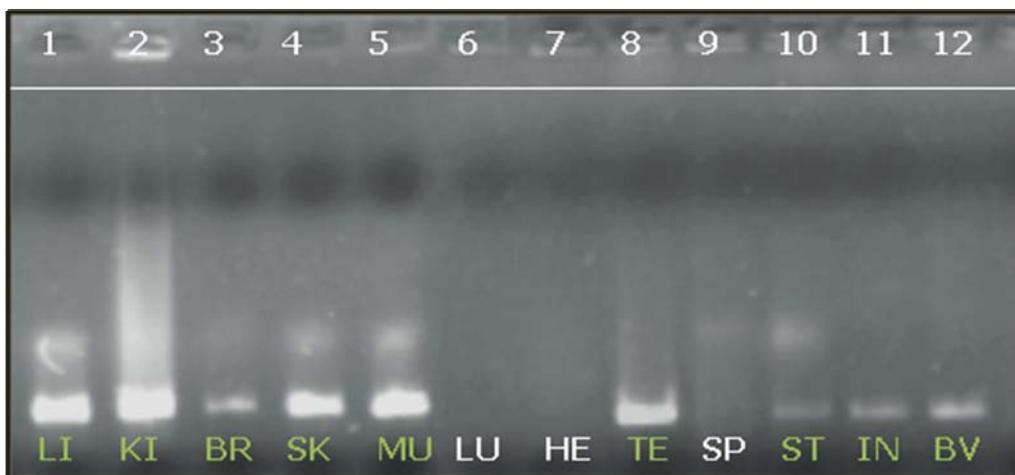


FIGURE 10. Analysis of the integration of DNA from piglets' tissues samples by PCR. Piglet n° 040. In green positive signal.



In the five pigs born alive, the DNA integration was analyzed in 8 different tissue samples, detailed in *table 40*. Presently, all live piglets born showed negative results in all tissue for DNA integration.

TABLE 40. Analysis of the integration of DNA from piglets' tissues samples by PCR. Samples from 5 alive born piglets.

	Tissues	Piglet n° 034	Piglet n° 035	Piglet n° 036	Piglet n° 037	Piglet n° 038
1	Skin	-	-	-	-	-
2	Cartilage	-	-	-	-	-
3	Blood	-	-	-	-	-
4	Muscle	-	-	-	-	-
5	Intestinal mucosa	-	-	-	-	-
6	Oral mucosa	-	-	-	-	-
7	Nasal mucosa	-	-	-	-	-
8	Liver	-	-	-	-	-

4.3.3.2 Analysis of the expression of EGFP protein in piglets

(1) Direct observation

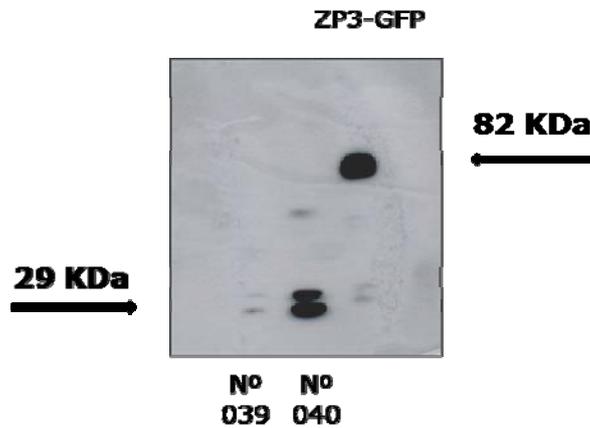
The expression of protein EGFP by direct observation of the animals illuminated under a UV lamp was analyzed. None of the 8 analyzed piglets showed green signal fluorescence.

(2) *Western Blot*

In samples from both positive animals, by PCR (n° 039 and 040) *Western Blot* analysis was used to detect the expression of protein EGFP in different tissues (*Table 41*). Using tissue samples of 100 µg of protein.

The positive control, for each one of the analyses, was made using ZP3-GFP with a molecular weight near 82 KDa. The EGFP from our analysis has a molecular weight of 29 KDa (*Figure 11*).

FIGURE 11. *Western Blot* for EGFP protein from liver samples (piglet's n° 039 and 040) with 29 KDa and positive control sample (ZP3-GFP, 82.2 KDa).

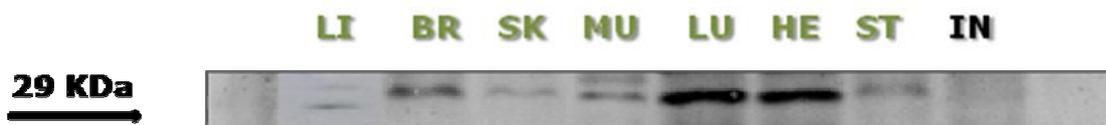


In the tissues from the **piglet n° 39** (*Table 41*) the expression of EGFP was detected in most of the samples, except from intestine (*Figure 12*). In the samples from skin and heart we detected the expression of the protein, even though the analysis by PCR detected no the DNA integration. The levels of expression of the detected EGFP were greater in samples from the lung and heart followed by the samples from brain and muscle.

TABLE 41. *Western Blot* for EGFP protein from tissue samples from piglet's n° 039 and 040. Levels of expression: (ND) no determined, (-) no signal, (+++) high signal, (++) medium signal, (+) low signal.

	Tissues	Piglet n° 039	Piglet n° 040
1	Liver (HI)	+	+++
2	Kidney (RI)	ND	++
3	Brain (CE)	++	-
4	Skin (PI)	+	++
5	Muscle (MU)	++	++
6	Lung (PU)	+++	ND
7	Hearth (CO)	+++	ND
8	Testicle (TE)	ND	ND
9	Spleen (BA)	ND	ND
10	Stomach(ES)	+	+++
11	Intestine (IN)	-	+
12	Blood vessels (PV)	ND	++

FIGURE 12. *Western Blot* for EGFP protein from tissue samples from piglet n° 039. Letters in green correspond to positive signal.



In the tissues from the **piglet n° 40** (*Table 41*) we detected the expression of EGFP in most of the samples, except from brain (*Figure 13*), although previously the DNA integration was detected. The levels of expression of the detected EGFP were greater in samples coming from liver and stomach.

FIGURE 13. *Western Blot* for EGFP protein from tissue samples from piglet n° 040. Letters in green correspond to positive signal.



The samples from intestine (piglet n° 039) and brain (piglet n° 040), were re-analyzed using higher concentration of protein (ranging from 115 to 185 μg), but the result was negative.

DISCUSSION

The transgenic animal production has been a great advance in the Biological studies, where it is an important tool for the study of genetic mechanisms of regulation and biological development. Since first use of transgenesis technology in 1981 (Gordon & Ruddle 1981) several improvements have taken place, and now there are several systems for DNA transference with a great efficiency and reduced costs. Within the last two decades, the SMGT technique has been the focus of numerous researchers in relation to transgenic animals. In 1989 a manuscript was published where it demonstrated the sperm capacity to transport exogenous DNA and to produce transgenic animals (Lavitano *et al.* 1989) by *in vitro* fertilization. This paper proposed an important advance in the field of the transgenesis, where SMGT could be considered, as the technique of election for the transgenic farm animal production due to their relative simplicity and low cost, and as a powerful tool for the biomedicine research. Using this technique 5-80% of the animals born were transgenic. The efficiency varies according to the species of application, improving remarkably the efficiency obtained by pronuclear microinjection, ranging between 0.5-4% (Niemann & Kues 2003).

The main objective of this Thesis was to contribute in the development of an efficient method of *in vitro* production of porcine transgenic embryos and transgenic piglets using the sperm ability to bind to exogenous DNA. In order to try to fulfill this main objective, we divided our study in to 3 sets of experiments: (1) Study of the capacity pig spermatozoa to transfer exogenous DNA; (2) *In vitro* production of transgenic embryos; (3) *In vivo* production of transgenic embryos and piglets.

5.1 EVALUATION OF THE PIG SPERMATOZOA-EXOGENOUS DNA BINDING CAPACITY

Numerous manuscripts have reported the use of SMGT technique in several species (Spadafora 1998; Smith & Spadafora 2005). Differences in the efficiency of the DNA transport and transgenic animal production have been observed in domestic animals (Smith & Spadafora 2005). Transgenic animal production has been reported with high efficiency in pig (more of 80% of the descendants were transgenic, Lavitrano *et al.* 2002), whereas the success was more limited in the production of transgenic goats (Schellander *et al.* 1995).

Differences in the degree of DNA binding have been detected between species (Spadafora 1998) as well as within the same species. In pigs, Castro *et al.* (1991) described only 0.3% spermatozoa were bound to exogenous DNA, while Camaioni *et al.* (1992) reported 78% of DNA binding. In addition, there are some contradictory reports between authors. Most of the authors describe that the binding takes place in the postacrosomal region and in the nucleus (Lavitrano *et al.* 1991, 1992), but other authors also find evidence of DNA-binding to other regions of the spermatozoa such as the acrosomal zone, acrosomal matrix, tail...(Atkinson *et al.* 1991; Huguet & Esponda 1998).

Initially, we investigated the capacity of exogenous DNA transfer of the pig spermatozoa under our experimental conditions. For it, the first study was to evaluate whether the presence of seminal plasma could affect the sperm DNA-binding. Next, we studied the kinetics of sperm DNA binding and the influence of the culture conditions. Then we evaluated the effect of the sperm treatments on the DNA binding and viability. Finally, localization of the DNA binding in the sperm cell was investigated.

5.1.1 Effect of the presence or absence of the seminal plasma in the spermatozoa exogenous-DNA binding capacity

5.1.1.1 Evaluation of the DNA binding capacity in ejaculated spermatozoa

If the sperm cells can act like vectors of exogenous gene sequences, the genome of sexually reproductive animals can be thus exposed to alterations by these genes transported by the spermatozoa, with important implications in the

evolutionary processes. Since the reproductive tracts contain free DNA molecules from different cells, it is reasonable to think that the sperm cells are highly resistant to binding of these molecules. It is likely that nature has formidable barriers against the SMGT, although these barriers are not absolute, owing to the successful results obtained with this technique. In order to avoid spermatozoa binding to exogenous DNA, enzymatic activity and seminal plasma may act as barriers. The spermatozoa are subjected to the addition of proteins from the epididymis and seminal plasma. These proteins could stabilize sperm membranes avoiding capacitation and spontaneous acrosome reaction (Vadnais & Roberts 2006). Therefore, the seminal plasma plays an important role acting as a natural barrier and protecting the spermatozoa from exogenous molecules that could compromise the integrity of the spermatozoa. Thus, the sperm plasma membrane is one of the obstacles that prevent the incorporation of exogenous DNA.

Some components of the seminal plasma have an inhibit effect on DNA binding. To verify the degree of inhibition we exposed varying amounts of seminal plasma to the medium (0%, 10% or 50%). In addition, the presence of exogenous DNA could induce toxic effects on the sperm functionality (Maione *et al.* 1997; Sciamanna *et al.* 2000), so we verified if under our experimental conditions, the presence of DNA affected the seminal quality.

Our results showed that the absence of seminal plasma was most effective, since the percentage of seminal plasma present during the incubation was inversely proportional to DNA binding. These results are coincident with Lavitrano's group (Lavitrano *et al.* 2003).

In the process of DNA binding involves 30-35 KDa proteins (Zani *et al.* 1995) and an inhibiting factor have been identified (determined as IF-1) in the seminal plasma and on the surface of the spermatozoa of the *sea urchin* (Lavitrano *et al.* 1992; Zani *et al.* 1995). These experiments suggested that elimination of seminal plasma rapidly as possible after the ejaculate collection is essential in this technique (Lavitrano *et al.* 2003).

The percentage of DNA binding described for boar spermatozoa vary widely. Castro *et al.* (1991) described only 0.3% of DNA-binding, while Camaioni *et al.* (1992) reported 78%, Horan *et al.* (1991) 30% and 12-17% (Gandolfi *et al.* 1996). A possible cause of these discrepancies between results could be due

to the elimination or it does not complete of the seminal plasma that would modulate the percentage of binding.

In the same way it was observed that a significant difference existed according to the boar used, where semen of boar 257 presents a greater percentage of binding in relation to the other boars. Selection of boars according the sperm DNA binding and viability capacity is also important for the effectiveness of this technique (Lavitrano *et al.* 2003)

5.1.1.2 Evaluation of binding spermatozoa-exogenous DNA in epididymal spermatozoa

In our experimental conditions, the epididymal spermatozoa presented a similar capacity of DNA-binding and viability than ejaculates spermatozoa (where the seminal plasma has been removed). Furthermore, it is necessary to explore the efficiency of epididymal spermatozoa in diverse applications (artificial insemination, *in vitro* fertilization and ICSI).

5.1.2 Evaluation of kinetic of binding between the spermatozoa and DNA

The possibility of knowing the kinetic of DNA-binding is of great importance for its use in later applications, for example, at the time of IVF, ICSI or artificial inseminations. The use of flow cytometry provides great advantages in this respect, because we can analyze a great amount of spermatozoa with the high sensitivity in a short period of time (500 cel/seg).

The results of 6 boars analyzed showed that most of DNA-binding takes place in the first 15 minutes of incubation. Later, during incubation, a gradual increase of DNA-binding occurs until a maximum of 120 min, and binding increased significantly when analyzed after 24 h. This data are in accordance with values showed by *Sperandio et al.* (1996) and *Lavitrano et al.* (2003) with spermatozoa of mouse, bull and pig, or human (*Camanioni et al.* 1992).

We obtained DNA-binding values slightly greater (not significant) from the same samples measured by epifluorescent microscopy than by flow cytometry. These small differences can be explained by diverse causes. In flow cytometry, the samples are under a high pressure that can break the weak DNA-binding to the sperm surface. Under microscopic observation false positive signals (non

specific bindings) that increases the percentage of positive cells. Both techniques of evaluation have inherent limitations and errors.

The flow cytometry offers great possibilities because it allows the use of two fluorochromes and evaluation of many cells compared to methods using microscopy. So, sperm viability and DNA-binding are evaluated at the same time, enabling analysis of a great number of cells per time unit, and the use of secure radioactive facilities are not required. Therefore, the flow cytometry is a great tool for the evaluation of the capacity of DNA-binding as previously described *Chang et al.* (2002).

5.1.3 Effect of culture medium on the spermatozoa binding to the exogenous DNA: TALP vs. SFM vs. SFM-PS

During the process of *in vivo* sperm capacitation, some of the components of the sperm membrane are modified or eliminated by secretions of the female reproductive tract. *In vitro*, the sperm capacitation is induced by incubating the spermatozoa in media supplemented with some reagents needed for capacitation (bicarbonate, calcium, albumin, etc.).

The objective was to verify the effect of media on the DNA-binding. With the use of two different media; one that prevent the capacitation (SFM, Lavitrano *et al.* 2002), and other that induce the sperm capacitation (TALP) because it contains calcium, albumin and bicarbonate, among other components, that are inductors of the sperm capacitation in the boar spermatozoa (Harrison *et al.* 1996).

When the spermatozoa were incubated in TALP media, a higher DNA binding was observed than when SFM media was used. During the capacitation process there is an alteration of the sperm membrane structure that is favorable for the DNA-binding process (Lavitrano *et al.* 2003).

5.1.4 Effect of the sperm treatment in the interaction DNA-spermatozoa

Our objective in this study was to evaluate if the sperm freezing treatment affected the spermatozoa DNA-binding capacity and viability. The frozen-thawed spermatozoa presented a smaller viability and a greater DNA-binding capacity

than the fresh spermatozoa. According to Anzar & Buhr (2006) the transfection, in bull spermatozoa, is more effective in frozen semen than in fresh spermatozoa ($49\pm 1.8\%$ vs. $29\pm 2.1\%$). Cryopreservation induces changes in the plasma membrane of the spermatozoa due to the low temperature and to high saline concentration that facilitate the DNA-binding and internalization (Anzar & Buhr 2006). It has been observed as cryopreserved spermatozoa show a destabilization of their membranes similar to the changes produced during the capacitation (Harrison 1997) denoted as "*capacitation like*". Therefore, in this particular moment in the initial steps of the capacitation, is when the binding of exogenous DNA to the live cells takes place. Boar selection for sperm freezing is essential in order to efficiently bind and transfer exogenous DNA.

When spermatozoa are subjected to an abrupt process of freezing (quick freezing) or treated by Triton X-100, we observed a drastic decrease in viability but obtained a high DNA binding that surpasses 90%.

Recently numerous groups have developed new treatments to improve the transport of DNA bound to the spermatozoa such as electroporation (Tsai *et al.* 1997) or complexes liposomes/DNA (Celebi *et al.* 2003). Shen *et al.* (2006) use complexes DNA/DMSO to obtain transgenic mice and rabbits. The treatment with DMSO has been successful for *in vitro* fertilization in rabbit (Li *et al.* 2006). In our conditions, the DMSO treatment did not increase the DNA-binding capacity. In mice and rabbits an initial step of cooling of the suspension (complexes ADN/DMSO and spermatozoa) to 4°C for a 10-15 min takes place. This methodology is not possible for boar spermatozoa because at this temperature they suffer cold shock (Pursel *et al.* 1973).

In many papers, the use of recombinase RecA has increased the production of transgenic embryos (Maga 2001; Maga *et al.* 2003; Kaneko *et al.* 2005). In our investigation, the incubation of the complexes RecA:DNA with the spermatozoa increased the percentage of dead cells and increase the DNA-binding.

In general and for all the studied groups, the majority DNA-binding is to dead cells or to cells with serious alterations of the membrane. The most likely hypothesis is DNA bound mainly to cells that display alterations in the membrane and which they would allow to bind to the perinuclear region.

Also it is possible that the binding to the DNA induces the alteration and death of the cell by the endonucleases activation. The apoptosis of the spermatozoa could be a natural phenomenon to prevent the transmission of exogenous DNA to the following generation (Anzar & Buhr 2006).

5.1.5 Effect of the DNA size on the capacity of binding to spermatozoa

Considering the model described to explain the process of DNA-binding and internalization in the spermatozoa (Spadafora 1998), the size of DNA molecules is likely to have an effect in the binding with the spermatozoa. So, it is reasonable to predict that the smaller DNA molecules are transferred with greater facility than molecules of larger size. In a study with *sea urchin* spermatozoa the efficiency to bind to exogenous DNA was inversely proportional to the size of molecules (ranging 1.25-2.5 Kbp; Arezzo 1989), whereas another later study using pig spermatozoa does not find relation between the DNA-binding and the molecular size between ranging 0.125-23 Kbp (Horan *et al.* 1991).

Our results are comparable to those obtained by *Moreira et al.* (2007) in mice using the same 2 types of DNA. They obtained embryos and alive descendants, without any significant difference between the transgenes used (*Moreira et al.* 2007). On the other hand, *Sperandio et al.* (1996), using pig and bovine spermatozoa, showed differences in production of transgenic embryos for different plasmids with different sizes (pSV2CAT-5003 bp, pALu-8081 bp, pRSV-LT-9035 bp).

5.1.6 Location of the interaction between DNA and spermatozoa

In 1991, *Atkinson* described in bovine, ovine and insects, four different sites of interaction to the exogenous DNA with the sperm cells: (i) acrosome (II) equatorial region (III) subequatorial region (IV) final part of the head, but most of the interaction occurred in the equatorial region. In our experiment, we have classified the location of the DNA in the spermatozoa in two regions: acrosoma and the postacrosomal region. *Anzar & Buhr* (2006) found 2 patterns of location of the exogenous DNA in the bull spermatozoa, the apical region of acrosome and in the postacrosomal zone. Whereas, *Gandolfi et al.* (1996), using pig

spermatozoa and similar technique of evaluation with digoxigenine, used an analogous classification.

In relation to the binding location, we observed that when the process of quick freezing in the spermatozoa is used, there is a greater tendency to bind to the acrosomal region. *Perry et al.*, in 1999, used electron microscopy to analyze the spermatozoa of mouse with membranes altered to different degrees (X-100 Triton, quick freezing, freezing-drying). They observed that with these treatments the rate of DNA binding is enhanced in the acrosomal region when sperm plasma membranes are made permeable through alteration. The use of different freezing methods showed a majority of acrosome reacted cells with the samples. The transgene is located in the acrosomal content (*Horan et al.* 1992b). Also, the DNA is located in the postacrosomal region and equatorial region, as previously shown in mice spermatozoa by *Lavitrano et al.* (1992). This region is implicated in the gamete fusion during the final steps of the fertilization (*Francolini et al.* 1993).

The electron microscope confirmed the previous results. In spermatozoa that did not present acrosome alteration, a significant amounts of gold signal in the apical region, as previously described *Gandolfi et al.* (1996). DNA was also observed in the region close to the sperm nucleus.

5.2 EVALUATION OF *IN VITRO* PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS

In the literature we did not find evidence of *in vitro* production of transgenic pig embryos by means of IVF, whereas it has been possible by ICSI (*Shim et al.* 2000; *Bolling et al.* 2003; *Lee et al.* 2003) although in a limited number of studies.

5.2.1 Evaluation of *in vitro* production of transgenic embryos by ICSI

One of the improvements that have taken place within the last year in the SMGT method has been the introduction of the intracytoplasmic injection of spermatozoa (ICSI) technique. *Perry et al.* (1999) published this method for the first time where they reported that when intact or altered membrane spermatozoa of mouse were incubated with DNA, and later injected in oocytes (ICSI), 20% of the descendants were transgenic. Nevertheless, the ICSI

efficiency in some domestic species has limited the application of this technique a limited number of them.

5.2.1.1 *In vitro* production of transgenic embryos by ICSI using fresh spermatozoa

The production of embryos was not affected by the initial incubation of the spermatozoa with exogenous DNA. Similar rates for embryo production and quality was obtained to the control. Our results are in accordance with data published by *Nagashima et al.* (2003). However, the rates are very limited as previously shown by *García-Roselló et al.* (2006). Authors have suggested that inadequate oocyte cytoplasmic maturation can be the cause of the low embryonic development (Kolbe & Holtz 1999; Probst & Rath 2003). The percentage of transgenic embryos production in our results (22%) were very similar to the data described by *Perry et al.* (1999) with mouse spermatozoa (26% of transgenic embryos), in *Rhesus* monkey spermatozoa (*Chan et al.* 2000a, 2000b; 36,4%), or boar spermatozoa using liposomes (*Lai et al.* 2001; 29,4%).

5.2.1.2 *In vitro* production of transgenic embryos by ICSI using different sperm treatment

Several authors, in different species, have combined the technique of ICSI and SMGT. In previous studies (*Kurome et al.* 2001; *Nagashima et al.* 2003), the use of frozen-thawed pig spermatozoa obtained 50% transgenic animals. We obtained 44.94% in our experiments. However, *Bolling et al.* (2003) obtained 7.3% of transgenic embryos. The success of the transgenesis was greater when mouse spermatozoa with damaged membranes were used (77% vs. 26%), and was 82% when using semen after a quick freezing process (*Perry et al.* 1999). In the porcine species, our results were very similar to *Lee et al.* 2003, when they use quick frozen spermatozoa. They found 81% of expression in the embryos compared to our 84% of expression.

When we used X-100 Triton like chemical agent to make permeable membranes, we obtained lower rates of transgenic embryos than control. *Perry et al.* (1999) obtained a 64% transgenic mouse embryos when they used Triton and *Shim et al.* (2000) obtained a 59% of expression in porcine embryos. It is known that Triton X-100 is not a natural product and could be toxic for the oocytes (*Moisyadi et al.* 2007).

The clearest evidence of DNA integration has been demonstrated by means of ICSI-SMGT. The plasma sperm membrane plays a critical role in the interaction with the DNA. So the membrane alteration facilitates the direct DNA interaction with the sperm chromatin increasing the integration probabilities.

The treatments of the spermatozoa with Triton and quick freezing could imply chromosomal breakage in the embryos (Szczygiel *et al.* 2003); reason why these authors suggested the possibility that this negative effect on the embryonic development is associate with chromosomic abnormalitys induced by the same exogenous DNA or by using conditions for increasing integration of the DNA.

We observed mosaicism in transgenic embryos produced by ICSI, as previously reported *Bolling et al.* (2003). In this same way, *Perry et al.* (1999) demonstrated that the embryos that contain some negative cells for expressing GFP have a greater capacity than those embryos that all their cells are positive for GFP. In addition, *Kurome et al.* (2006) affirmed that the SGMT-ICSI is a method that produces a smaller number of cases of mosaicism than pronuclear microinjection.

5.2.1.3 *In vitro* production of transgenic embryos by ICSI using spermatozoa treated with RecA recombinase

The use of RecA supposed a considerable improvement in transgenic embryos production, is to review that in 7 of the 9 replicates the 100% of the embryos were transgenic. It has been verified that RecA protects ssADN of the degradation creating a protective coating (Chow *et al.* 1986). This mechanism of protection also has been suggested influences in the stability of ssADN during the transgenesis process using the pronuclear microinjection with complexes RecA:ssADN in the species pig and goat (Maga 2001; Maga *et al.* 2003).

5.2.2 *In vitro* production of transgenic embryos by IVF using fresh and treated spermatozoa with RecA recombinase

Several researchers have assayed the use of porcine IVF for transgenic embryo production but none was successfully (Horan *et al.* 1992b; Lai *et al.* 2001; Bolling *et al.* 2003). *Chan et al.* (2000a, 2000b) was not able to obtain any transgenic embryos using primate spermatozoa by IVF but was successful in obtaining transgenic embryos by ICSI. Nevertheless, there has been limited

success in other species such as in bovine (Gagné *et al.* 1991; Sperandio *et al.* 1996; Rieth *et al.* 2000). Porcine IVF with spermatozoa coincubated with exogenous DNA and RecA did not produce any transgenic embryos with EGFP expression.

5.3 EVALUATION OF *IN VIVO* PRODUCTION OF TRANSGENIC EMBRYOS AND PIGLETS

The objective of the transgenesis technology is to produce animals where the incorporation of transgene is stable (Wheeler & Walters 2001). Several research groups have produced transgenic pigs using SMGT (Lavitrano *et al.* 1997, 1999, 2002, 2003; Lai *et al.* 2001; Chang *et al.* 2002; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006). Lai *et al.* (2001) and Chang *et al.* (2002) used liposomes and monoclonal antibodies respectively like nexus of binding between DNA and spermatozoa, whereas, Kurome *et al.* (2006) and Yong *et al.* (2006) used frozen-thawed spermatozoa to increase the interaction with the DNA. Lavitrano *et al.* (1997, 1999, 2002, 2003) incubated spermatozoa for 2 h. In most of the experiments, artificial insemination was used to produce transgenic animals (Lavitrano *et al.* 1997, 1999, 2002, 2003; Chang *et al.* 2002). Others experiments produced transgenic embryos by ICSI and were transferred to receiving females (Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006).

5.3.1 *In vivo* production of transgenic embryos by deep laparoscopic intrauterine artificial insemination

In our studies used surgical and nonsurgical deep insemination intrauterine with a low number of spermatozoa. These experimental conditions could minimize the possibility of sperm competition. Recently, Martinez *et al.* (2002), a nonsurgical deep intrauterine insemination technique has been developed, which can be used to deposit a small number of spermatozoa in the uterine horn, obtaining good fertilization to size of the litter ratio. Also artificial insemination close to the oviductal tube (accessed by surgical laparotomy) has shown good results with fresh (Krueger & Rath 1999, 2000) and frozen semen (Polge *et al.* 1970), with fertilization rates close to 90% (Fantinati *et al.* 2005).

The fertility rate and litter size obtained in our experiment was similar to the rates obtained by Martinez *et al.* (2001), using the same sperm

concentration (15×10^7). Nevertheless, when the expression and the integration of transgene was analyzed, there was no evidence of transgenesis in any of the 22 born piglets. Our results are consistent with those obtained by *Gandolfi et al.* (1996), who obtained 126 piglets from 35 females inseminated although none were transgenic. But that same year *Sperandio et al.* (1996) reported that, after the insemination of 10 sows with semen incubated with plasmid pSV2CAT, a total of 82 pigs were farrowed and 5 were transgenic. The best result in the production of transgenic pigs by means of SMGT-AI has been reported by *Lavitrano's* group (*Lavitrano et al.* 1997, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2003, *Smolenski et al.* 2007). They reported that ~80% of the pigs had integrated the transgene in their genome and transmitted to the lineage.

The embryos recovered after the surgical insemination in the oviductal tube were not transgenic. Our results contrast with those obtained by *Fantinati et al.* in 2005. They used a similar dose of insemination (1.5×10^8 spermatozoa/1.5 ml by horn). However, they use laparoscopy, instead of laparotomy. They reported that 80% of blastocysts expressed GFP. In the same way, *Chang et al.* (2002) obtained 13% transgenic pigs using the surgical oviductal insemination, using antibodies like nexus of binding between the plasmid and spermatozoa.

5.3.2 Production of transgenic piglets by embryo transfer

In the last years the transgenic pigs have been indispensable in the field of the biomedicine and applied in several research areas (*Petters & Sommer* 2000; *Niemann et al.* 2003; *Prather et al.* 2003). Nevertheless, the pronuclear microinjection is not efficient in the production of transgenic pigs. *Perry et al.* (1999) published an alternative method for the production of transgenic mice called ICSI-SMGT. In addition a new transgenesis model has been developed in which ICSI-SMGT is combined with recombinase and transposase to increase the efficiency of the transmission of the exogenous gene. This technique has been denominated "*active transgenesis*" (*Shinohara et al.* 2007).

In this experiment, we studied the possibility of producing transgenic pigs by ICSI-SMGT and the use of recombinase RecA. After the embryo transfer to 4 receipt females, we obtained one pregnancy (25%). Just a few research groups have been able to obtain piglets by ICSI derived embryo (*Kolbe & Holtz* 2000; *Martin* 2000; *Lai et al.* 2001; *Nakai et al.* 2003; *Probst & Rath* 2003; *Naruse et*

al. 2005; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006; Katayama *et al.* 2007). The success of using ICSI with *in vitro* matured oocytes is limited even more (Lai *et al.* 2001; Nakai *et al.* 2003; Naruse *et al.* 2005; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006; Katayama *et al.* 2007).

Using ICSI-SMGT technique, the fertility rate ranges from 17% obtained by Yong *et al.* (2006) (from 6 embryo transfer), to 40% obtained by Kurome *et al.* (2006) (2 pregnancies from 5 embryo transfers). Naruse *et al.* (2005) obtained a 33% (1/3 transfers), and is similar to our result of 25%. Altogether we obtained 8 pigs, of which three were born dead. In general, in the studies using porcine ICSI and embryo transfer, the number of obtained piglets is very low. The first birth of pigs described after ICSI, were using *in vivo* matured oocytes (Kolbe & Holtz 2000; Martin 2000; Probst & Rath 2003) and the greatest litter size was 6 (Probst & Rath 2003). Later the use of *in vitro* matured oocytes lead to obtain 3 piglets per litter (Nakai *et al.* 2003 and Kurome *et al.* 2006) and recently, Katayama *et al.* (2007), reported 6 piglets born from the same litter. If we consider the combination of techniques, ICSI-SMGT the success rate is smaller still, where only one single piglet per litter was obtained (Lai *et al.* 2001; Naruse *et al.* 2005; Kurome *et al.* 2006; Yong *et al.* 2006).

Of 8 pigs born two (25%) were transgenic, and integrating transgen was integrated in most of the analyzed tissues (~75%). Therefore, our study has demonstrated that the production of transgenic pigs by using ICSI-SMGT and RecA is possible. Previously, Yong *et al.* (2006) transferred embryos produced by ICSI and spermatozoa from a transgenic boar (created by Cabot *et al.* 2001) to 6 recipient females and obtained a single transgenic pig. On the other hand, Naruse *et al.* (2005) after 3 embryo transfer obtain a single transgenic pig. According to Szczygiel *et al.* (2003) the technique of ICSI-SMGT in mouse the percentage of transgenic animals generated by ICSI is less than 10%. Perry *et al.* (1999) observed that the potential development of the embryos decreases according to increases the proportion of fluorescent blastomeres, and the co-injection of the DNA has a negative effect in the post-implantational development. These observations suggest ICSI-SMGT must cause some negative effect to the embryonic development (Szczygiel *et al.* 2003). The negative effect in the expression of EGFP in the consequent development of the embryos may have contributed to the failure in the pregnancies in our experiment, as well as the reduction in the number of transgenic pigs produced. This phenomenon was observed by Perry *et al.* (1999), which suggests that to obtain of transgenic pigs a high number of embryos must be transferred.

The transgene integration was detected in 75% of the analyzed tissues. But it is important to review that organs of vital importance for xenotransplantation like liver, kidney, stomach or intestine had the transgene integrated. The transgenic pigs in this study did not survive, which can be attributed to a great number of integrated copies of transgene (Naruse *et al.* 2005). In this course, Yamauchi *et al.* (2007) observed a clear increase in the incidence of abnormal karyotypes after the incubation of the spermatozoa with DNA. These breakages were detected by chromosomal analysis and is of relatively import for later embryonic development.

The mosaicism associated to the use of RecA:ICSI could be due to a delayed integration of the transgene in the host genome after the first cellular division (Kaneko *et al.* 2005). Thus, Shinohara *et al.* (2007) affirmed that one of the problems of the active transgenesis in mice is the high level of mosaicism. According to Chan *et al.* (1999), the process of integration in the embryos that express GFP in 100% of the blastomeres, probably occurred, in the first cellular cycle, the pronuclear state before the replication of the DNA. In the embryos that have 50% of the cells expressing GFP, there are two ways: 1) the integration of transgene occurred after the replication of the DNA in the first cellular cycle; or 2) the integration occurred before the replication of the DNA in the second cellular cycle, at the two cells stage. Similarly, an embryo that expresses GFP in 75% cells, probably was from a combination of numerous integration events.

For the expression of the transgene EGFP, we obtained a consistent expression evaluated by means of *Western Blot*, and was shown in 87.5% of the organs and tissues. Only two tissues that showed integration of the transgene did not express GFP (intestine from piglet n° 039 and brain from piglet n° 040). In addition, analysis by PCR was negative in the pig n° 039 in skin and heart, although there was expression of the EGFP in both tissues. This can be due to a possible degradation of the DNA of the samples of gels before making the PCR. The *Western Blot* was repeated in 3 replicates and found all to be the same results. The numerous visible bands in some of gels analyzed by *Western Blot*, non corresponded to the molecular weight of EGFP (29 KDa), are nonspecific and likely to be caused by high protein content (Lavitrano *et al.* 2002), or due to unspecific binding to the secondary antibody.

The success of the piglet births by means of ICSI in this experiment opens the way for the production of transgenic pigs by ICSI-SMGT using IVM oocytes and spermatozoa incubated with complexes RecA:ssADN.

METHODOLOGICALLY NEW FEATURES

- Is the first study that compares diverse methods of location and evaluation of the DNA binding to sperm after different sperm treatments.
- In addition, is the first work where the spermatozoa DNA-binding capacity is evaluate directly by flow cytometry.
- The use of recombinase RecA in the pig species.
- Is to emphasize the pregnancy obtained by ICSI derived embryo transfer, due to the limited success in the use of this technique of fertilization.
- First pigs born in Spain by ICSI derived embryo transfer.
- The greater litter size obtained in the world by ICSI derived embryo transfer.
- First transgenic piglets born in Europe and fourth in the world by ICSI derived embryo transfer, and first combining the use recombinase (RecA) with ICSI-SMGT.
- The greater number of transgenic pigs in a same litter produced by ICSI-SMGT.

FURTHER RESEARCHES

The possibilities and applications that this research in the field of the transgenic animals offers are very numerous and diverse lines of study could be carried out in the field of transgenic pigs using the sperm binding capacity to exogenous DNA, suggested lines of studies are:

 **Specific studies about spermatozoa and DNA binding and the co-culture conditions:**

- ✿ An important aspect would be the use with a sperm sub-population bound to the DNA. The use of cytometry "*cell sorter*" could select this sperm sub-population. Later we will be able to use these spermatozoa for ICSI, AI, sperm studies...
- ✿ Similarly, it is of importance of meticulous study of the interaction of spermatozoa with the DNA by means the use of the confocal microscope that allows understanding of the binding process and its use.
- ✿ DNases to know what the proportion of DNA is bound to the spermatid nucleus and to the surface.
- ✿ Also it would be of interest to study the use of different concentrations from transgene and how it affects to the sperm viability and the DNA binding by means of the use of flow cytometry.
- ✿ Study the use of epididymal spermatozoa. The spermatozoa have not contacted with seminal plasma and its inhibitory factors. It is a good model to study the DNA binding and may present a great advantage compared to ejaculated spermatozoa.

- ✿ To introduce *in vitro* DNA marked with fluorescence in porcine epididymal obtained in the slaughterhouse and evaluate the DNA-binding capacity. This method could be applied to live animals using the spermatozoa bound to DNA by artificial insemination.



Research activities that increase the yield of the *in vitro* transgenic embryo production and its application in *in vivo* conditions:

- ✿ To use spermatozoa incubated with DNA marked with rhodamine or fluorescein for ICSI using a fluorescent inverted microscope. This way we can observe which spermatozoa introduced to in the oocyte by ICSI is bound to DNA and allows us to follow the evolution of DNA inside of oocyte/zigote.
- ✿ Improvement the embryonic culture in pig, thus enable greater amount of transgenic blastocysts with good quality. Then to transfer these to recipient females with an increased percentage of success.
- ✿ Explore the use of frozen-thawed spermatozoa in IVF and AI. The percentage of live cells bound to DNA is greater than fresh sperm and also greater probability of obtaining embryos and pigs genetically modified.



Studies for the production of transgenic pigs in diverse scopes:

- ✿ Possibility of incubating the spermatozoa with diverse genes and of creating, multitransgenic embryos and piglets by embryo transfer.
- ✿ To produce transgenic pigs with the gene of our interest and to clone these from its somatic cells, using *in vitro* matured oocytes without nucleus for use as recipient cells. Thus being able to maintain genetic lines from transgenic pigs.

CONCLUSIONS

- 1) Pig spermatozoa are able to bind to exogenous DNA, even though are noticeable differences between the different males evaluated.
- 2) Flow cytometer lead us to evaluate an objective, fast and effective way the percentage of DNA-binding to the spermatozoa.
- 3) The presence of the seminal plasma partially inhibits the DNA-binding to the spermatozoa.
- 4) DNA-binding to spermatozoa is a fast process, where the greater percentage of binding takes place in the first 15 minutes of incubation.
- 5) Porcine spermatozoa can bind exogenous DNA with the same efficiency, whether 5.7 Kbp and 10.3 Kbp.
- 6) Sperm treatments affect to the DNA-binding, and this relationship is inversely proportional to sperm viability.
- 7) Exogenous DNA binds to spermatozoa in the postacrosomal, acrosomal region and the area corresponding to the nuclear region.
- 8) The use of IVF-SMGT does not allow the production of transgenic porcine embryos.
- 9) The production of transgenic embryos by ICSI-SMGT is an effective method in the pig. The different sperm treatments affect the efficiency

of the technique. The treatment with RecA gave rise to greatest percentage of transgenic embryos.

10)The intrauterine artificial inseminations (surgical and non-surgical) did not allow the production of transgenic embryos and pigs in our experimental conditions.

11)The production of transgenic pigs by embryo transfer produced by ICSI is a viable method in the pig.

