

**EXPRESION DE UN GEN EXOGENO EN EMBRIONES DE CERDO OBTENIDOS
MEDIANTE FECUNDACION "IN VITRO" CON ESPERMATOZOIDES TRATADOS
CON ADENOVIRUS DE REPLICACION DEFICIENTE COMO VECTORES**

J.E. Rodríguez Gil*, L. Farré*, T. Rigau* y A.M. Gómez Foix*

* Dep. Patología y Producción Animales. Facultad de Veterinaria.
Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra

+ Dep. Bioquímica y Fisiología. Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad de Barcelona. Barcelona

Introducción

La utilización de adenovirus de replicación deficiente, como vectores para la introducción de genes exógenos, es uno de los métodos actuales más eficaces cuando se trabaja con células eucariotas sin poder de replicación (1-4).

Recientemente, hemos podido observar que la incubación de espermatozoides de verraco con adenovirus de replicación deficiente que contenían el gen *LacZ* de *E. coli* (adCMV-βGal adenovirus) provocó como resultado la aparición de una señal positiva para el gen *LacZ*, cuando el DNA de los espermatozoides se analizaba mediante hibridación "in situ" y mediante Southern blot (5). Además, cuando los espermatozoides se trataban con DNA desnudo en lugar de con los adCMV-βGal, si bien se obtenía una señal positiva en el Southern blot, esta señal se perdía casi completamente en la hibridación "in situ" (resultados no publicados). Puesto que la hibridación "in situ" supone la destrucción de gran parte de la estructura membranosa del espermatozoide, la pérdida de señal del DNA desnudo sugiere que éste se asocia con las membranas, mientras que el DNA del adCMV-βGal se asocia más profundamente en la célula, aunque con casi toda seguridad no llegará a integrarse en el genoma.

El siguiente paso consistió en observar si los espermatozoides tratados con adCMV-βGal eran capaces de pasar este gen a un embrión después de una fecundación "in vitro". Este ha sido el objetivo de los resultados expuestos a continuación.

Material y métodos

En un matadero comercial se recogieron ovarios de cerdas maduras, los cuales se transportaron hasta el laboratorio a 37 °C en 0.9% NaCl con 100 µg/mL penicilina y 10 µg/mL estreptomycin. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron troceados en medio TCM-199 con 26,18 mM NaHCO₃ y 5% suero fetal

bovino (FCS) inactivado con calor (medio TCM/1) a 37 °C. Seguidamente se buscaron los complejos cumulus/oocitos de buen aspecto. Estos se lavaron 3 veces con medio TCM/1 a 37 °C. Una vez limpiados, los oocitos se introdujeron de 10 en 10 en microgotas de 50 µL de un medio TCM-199 con 26,18 mM NaHCO₃, 10% FCS inactivado con calor, 0,1 mg/mL piruvato sódico, 0,9 mg/mL lactato sódico, 0,55 mg/mL glucosa, 60 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, 10 µg/mL FSH, 10 µg/mL LH y 1 µg/mL estradiol a pH 7,8 (medio TCM/2). Las microgotas se cubrieron con aceite mineral y se incubaban a 39 °C durante 42 horas.

Pasado este tiempo, una dosis de inseminación de 100 mL de semen de verraco en medio MR-A obtenida ese mismo día se concentró en medio MR-A hasta los 10⁸ espermatozoides/mL. Seguidamente unos 15x10⁶ espermatozoides se incubaron con 1,5 mL de una suspensión que contenía unas 15x10⁷ partículas adCMVBGal en medio TCM-199 con 26,18 mM NaHCO₃ y 10% FCS inactivado por calor (medio TCM/3) (BGal espermatozoides), o bien con 1,5 mL de medio TCM/3 (espermatozoides control). La incubación se mantuvo durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, los espermatozoides se lavaron repetidamente con medio TCM/3 a 37 °C y finalmente se resuspendieron a una concentración de 2x10⁸ espermatozoides/mL, manteniéndose a 37 °C durante 3 horas más.

Finalmente, los oocitos se agruparon de 15 en 15 en 2 mL de medio TCM/2 adicionado con 10 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA), 2 mM cafeína y 5,8 mM lactato cálcico a pH 7,4 (TCM/4). Se mantuvieron así durante 15 min a 39 °C, y seguidamente se añadieron espermatozoides hasta una concentración final de 3-5x10⁴ espermatozoides/mL. El co-cultivo se mantuvo durante 6 h a 39 °C. Seguidamente, se eliminaron a los oocitos las células del cumulus y los espermatozoides adheridos y se cultivaron en medio de Whittens modificado sin glucosa (6), el cual se cambió cada 48 horas. A las 48, 96 y 144 horas se recogieron muestras, y todas aquellas que fueron reconocidas como embriones en diferentes estadios se fijaron y se trataron para proceder a una hibridación "in situ" de mRNA mediante sonda marcada con digoxigenina (7).

Resultados y Discusión

En total, de aproximadamente unos 2000 oocitos tratados para su maduración, se obtuvieron unos 75 embriones. 50

correspondieron a embriones fecundados con β Gal espermatozoides, y el resto fecundados con espermatozoides control. En los controles, aproximadamente 20 embriones llegaron a los estadios entre 4 células a mórula, 4 a mórulas expandidas y 1 se reconoció como blastocisto. En los β gal, unos 35 llegaron a los estadios entre 4 células a mórula, 8 eran mórulas expandidas y encontramos 2 blastocistos. Mediante la hibridación "in situ", se observó que ningún embrión control expresaba el gen *LacZ*. En cambio, aproximadamente unos 25 embriones entre 8 células y mórula, 6 mórulas expandidas y 1 blastocisto mostraban una expresión difusa y uniforme del gen *LacZ*. Conviene destacar que la intensidad de la tinción ligada a la expresión fue muy similar fuera cual fuese el estadio embrionario, lo cual sugiere que el gen se encuentra integrado uniformemente en todas las células embrionarias. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la utilización de espermatozoides tratados con adenovirus de replicación eficiente puede ser una herramienta útil para la introducción de genes exógenos en embriones de cerdo.

Bibliografía

- 1.- GOMEZ-FOIX, A.M., COATS, W.S., BAQUE, S., ALAM, T., GERARD, R.D. y NEWGARD, C.B. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25129-25134.
- 2.- LEMARCHAND, P., JAFFE, H.A., DANIEL, C., CID, M.C., KLEINMAN, K., STRATFORD-PERRICAUDET, L.D., PERRICAUDET, M., PAVIRANI, A., LECOCQ, J.P. y CRYSTAL, R.G. (1992) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 6482-6486.
- 3.- KIRSHENBAUM, L.A., McLELLAN, W.R., MAZUR, W., FRENCH, B.A. y SCHNEIDER, M.D. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 381-387.
- 4.- LaSALLE, G.L.G., ROBERT, J.J., BERRARD, S., RIDOUX, V., STRAFFORD-PERRICAUDET, L.D., PERRICAUDET, M. y MALLETT, J. (1993) *Science* 259, 988-990.
- 5.- RODRIGUEZ-GIL, J.E., RIGAU, T., FARRE, L. y GOMEZ-FOIX, A.M. (1994) *Proceedings de las 7as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal*, Murcia. p. 49.
- 6.- PETTERS, R.M. y WELLS, K.D. (1993) *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48, 61-73.
- 7.- HEILES, H.B.J., GENERSCH, E., KESSLER, C., NEUMANN, R. y EGGERS, H.J. (1988) *BioTechniques* 6, 978-981.