

INMUNOLocalización DE LAS MOLÉCULAS DE ADN EXÓGENO EN LOS ESPERMATOZOIDES PORCINOS SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS

F García-Vázquez, D Gumbao, ¹A Gutiérrez-Adán y J Gadea

Dept. Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

¹Dept. Reproducción Animal, INIA, Madrid. E-mail: fagarcia@um.es.

<http://www.um.es/grupo-fisiovet>

INTRODUCCIÓN

La transgénesis ha sido uno de los más recientes e importantes avances en la biotecnología animal, existiendo aplicaciones en diversas áreas tales como la investigación biológica, biomédica, genética (genes implicados en el cáncer, regulación del sistema inmunológico, control del crecimiento), agropecuaria (mejora de la producción, resistencia a enfermedades), modelos animales como donadores de órganos, etc. Bracket et al. (1971) fueron los primeros en demostrar que los espermatozoides de los mamíferos tienen la habilidad intrínseca de unirse a ADN exógeno. En 1989, Lavitrano et al. usando el ratón como modelo, publican que la capacidad de los espermatozoides de unirse a ADN podría ser usada para introducir ADN exógeno en los ovocitos durante la fecundación para conseguir producir animales transgénicos. Esta publicación generó un gran interés en la comunidad científica porque “la transferencia de ADN por los espermatozoides” era un proceso simple y de bajo coste. Sin embargo, las dificultades en la reproducibilidad y la baja eficiencia en la integración de los transgenes en el genoma del animal, provocó una considerable controversia durante numerosos años (Brinster et al. 1989). No obstante, numerosos trabajos han sido publicados en los últimos años confirmando que los espermatozoides de numerosas especies, incluidas las de granja, y peces, pueden ser usados como vectores para llevar transgenes dentro del genoma del animal (Smith y Spadafora 2005).

El propósito de esta experiencia fue en primer lugar identificar el porcentaje de unión y en qué lugar específico del espermatozoide se une el transgén. Para ello, el ADN utilizado había sido marcado previamente con digoxigenina (DIG), para posteriormente ser detectado con el uso de anticuerpos anti-DIG. Y en segundo lugar se estudió que efecto presentaban diferentes grados de alteración de las membranas espermáticas (intactos, espermatozoides sometidos a un proceso de congelación rápida y criopreservados) sobre la localización del transgén en el espermatozoide.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación espermatozoides: Se ajustó la concentración de la suspensión espermática a 10^8 células espermáticas/ml a los que se le añadió 5 μ g del ADN exógeno/ml. El gen utilizado fue eGFP marcado con digoxigenina. Los tratamientos espermáticos llevados a cabo fueron los siguientes:

- **Semen fresco con membranas en su mayoría intactas (In):** El semen fue preparado por el método descrito por Lavitrano *et al.* (2003). Tras la recogida de la fracción rica del eyaculado y la dilución del semen 1:1 en medio SFM sin BSA, fue trasladado al laboratorio a 37° C. Posteriormente, se diluyó de nuevo en medio SFM (37° C) en una proporción de 1:10, y se centrifugó dos veces a 800g durante 10 min a 25° C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en SFM con BSA.

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

- **Rotura de las membranas por congelación/descongelación rápida (CR):** los espermatozoides intactos se sometieron a un proceso de congelación rápida sumergiendo las muestras en nitrógeno líquido durante 20 seg, seguido de una inmediata descongelación por inmersión en un baño de agua atemperada a 37° C. Este proceso se repitió 3 veces.

Inmunocitoquímica: El ensayo con peroxidasa 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 (H_2O_2) genera una señal de coloración marrón. En primer lugar los espermatozoides fueron incubados con el plásmido marcado con DIG. Se realizaron extensiones con los espermatozoides que fueron secadas al aire. Para el bloqueo de la actividad peroxidasa celular endógena, se preparó una solución de 1 ml de H_2O_2 en 100 ml de PBS. 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. 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. Una vez finalizado el tiempo de incubación procedimos al revelado de la HRP mediante el empleo de una solución que contenía: 90 μ l Diaminobencidina (DAB), 100 ml de PBS y 100-200 μ l de H_2O_2 . Para realizar el revelado las muestras se mantuvieron en la solución de revelado por un periodo de 30 min. La valoración de los espermatozoides se realizó empleando el microscopio óptico de contraste de fases (Leica® modelo DM LS) bajo objetivo de inmersión (100X).

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). Una vez marcados los espermatozoides, estos se clasificaron según la localización del ADN: 1) ADN en región acrosomal, 2) ADN en región post-acrosomal, 3) ADN en región acrosomal y post-acrosomal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espermatozoides sin ninguna alteración de sus membranas (In) se unen en menor proporción al ADN que los espermatozoides sometidos a un proceso de C-D y a su vez menos que los espermatozoides con alteraciones de sus membranas por CR (51.08 \pm 6.79% vs. 71.47 \pm 4.44% vs. 82.33 \pm 5.74%, $p < 0.01$, respectivamente) (Tabla 1). En relación al patrón de unión hemos expresando en la Tabla 1 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 post-acrosomal y al de unión a toda la cabeza espermática suma el 100%). La localización del transgén predomina en la región post-acrosomal, que se mantiene en valores similares sin ninguna diferencia significativa para los tres grupos experimentales (61.93 \pm 5.23 vs. 63.04 \pm 3.72 vs. 45.16 \pm 7.71, $p = 0.06$). No obstante, en los espermatozoides sometidos a un proceso de CR hay un mayor porcentaje de unión en el acrosoma (acrosomas + ambas) (51.89 \pm 7.24 + 2.94 \pm 0.87) que en los otros dos grupos restantes (In: 27.03 \pm 5.31 + 11.03 \pm 3.06; C-D: 30.10 \pm 3.17 + 6.85 \pm 1.73 (Tabla 1). Observamos que en la mayoría de los espermatozoides que tenían los acrosomas dañados (sobre todo por procesos de congelación), la tinción se encontraba localizada concretamente en el contenido acrosomal.

En general, y para todos los procesos espermáticos, la localización del ADN exógeno tiene lugar principalmente en la región post-acrosomal, tal y como han descrito previamente otros autores (Gandolfi et al. 1996). Cuando se usa el proceso de CR 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), 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. 1992).

En conclusión, los espermatozoides con un alto grado de alteración de sus membranas mejoran la interacción con el transgén y cambia el patrón de unión del ADN dependiendo del tratamiento usado, presentando una tendencia de unión a la región post-acrosomal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowski H. PNAS 1971, 68:353-57.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. Cell. 1989, 59:239-41.
- Gandolfi F, Terqui M, Modena S, Brevini T, et al. Reprod. Fert. Dev. 1996, 8:1055-60.
- Horan R, Powell R, Gannon F, Houghton JA. Arch Androl 1992, 29:199-206.
- Lavitrano M, Camanioni A, Fazio VM, Dolci S, et al. Cell 1989, 57: 717-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, et al. Mol Reprod Dev 2003, 64:284-91.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, et al. Science 1999, 284:1180-3.
- Smith K, Spadafora C. Bioessays 2005, 27:551-62

Tabla 1. 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
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 ($p < 0.05$)

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por 10BIO2005/01-6463 y AGL2006-03495GAN.

IMMUNOLOCATION OF THE INTERACTION BETWEEN EXOGENOUS DNA AND SPERMATOZOA UNDER DIFFERENT TREATMENTS

ABSTRACT: Sperm mediated DNA transfer can be used to transfer exogenous DNA into the oocyte for the production of transgenic animals. The main objective of this study was to compare the degree of binding and localization of exogenous DNA in boar sperm under different degrees of permeabilisation of their membranes, whether intact sperm or cryopreservation or structural alteration of sperm membranes through repeated process of freezing/thawing into liquid nitrogen without cryoprotectants. The results showed that fresh spermatozoa presents the lower percentage of binding to the DNA, and when we observed frozen-thawed or quick frozen spermatozoa, it increases the proportion of DNA bound spermatozoa (51.08 ± 6.79% vs. 71.47 ± vs. 4.44%. 82.33 ± 5.74%, $p < 0.01$, respectively). The binding to the sperm post-acrosomal region predominates in three experimental groups (61.93 ± 5.23 vs. 63.04 ± 3.72 vs. 45.16 ± 7.71, $p = 0.06$). In conclusion, sperm with a higher degree of alteration of their membranes improve the interaction with the transgene and changes the DNA binding pattern depend on treatment used, since it tends to be bound to the post-acrosomal region.

Keywords: spermatozoa, exogenous DNA, SMGT, transgenic pig.