

Clonación de Gametas y Transgénesis Mediada por Fertilización In-Vitro en Bovinos

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área
Ciencias Agropecuarias*

GABRIEL DAMIÁN VICHERA
Licenciado en Biotecnología - UNSAM - 2006

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía,
Universidad de Buenos Aires (UBA), Capital Federal, Argentina.



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO DE TESIS DOCTORAL

Director de tesis

Dr. Daniel Felipe Salamone

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)

Ph.D (Universidad de Massachusetts)

Consejero de Estudios

Dr. Martín Radrizzani Helguera

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Ph.D (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS DOCTORAL

Ramiro Alberio, PhD

School of Biosciences, University of Nottingham, UK

Mariano G. Buffone, PhD

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET

Laura C. Giojalas, PhD

Centro de Biología Celular y Molecular (CEBICEM), Universidad Nacional de Córdoba

Calificación: **Sobresaliente**

Buenos Aires, 17 de Septiembre de 2012

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Lic. Gabriel Vichera

Licenciado en Biotecnología
(Universidad Nacional de San Martín)

Declaro que la tesis doctoral que lleva por título “**Clonación de Gametas y Transgénesis Mediada por Fertilización In-Vitro en Bovinos**” de la que es autor el Lic. Gabriel Vichera, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple todas las condiciones necesarias para su lectura.

Dr. Daniel Salamone

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)
Ph.D (Universidad de Massachusetts)

AGRADECIMIENTOS

- *A mis padres y hermana por su apoyo incondicional.*
- *A Valen, por hacerme con cada sonrisa, cada beso, cada mirada, cada abrazo, la persona más feliz del mundo...*
- *A Luchi por alegrar y llenar de amor mi vida día a día...*
- *A mi director de Tesis Daniel Salamone, por haberme dado la oportunidad de aprender a su lado a lo largo de estos años, y sobre todo por hacer realidad el sueño de mi Tesis Doctoral.*
- *A mis compañeros de laboratorio: Cauchi, Fede, Rafa, Romi, Nati, Diana, Javi, Andres, Ine, Carla, y especialmente a Rama por su colaboración y fundamentalmente por soportarme durante todos estos años.*
- *A la Universidad Pública y Gratuita Argentina.*

A Valentina...

*El destino es el que baraja las cartas,
pero nosotros somos los que las jugamos.*

William Shakespeare

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

-PREMIOS Y DISTINCIONES

- **2011- Premio Estímulo Investigador Joven.**

Trabajo: “Clonación y multiplicación del genoma espermático aplicado en reconstrucción de embriones. Otorgado por: **Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva.** Marriot Plaza Hotel – Buenos Aires. 1 de Abril, 2011.

- **2010- Runner up Award, Student Research Competition (IETS).**

Trabajo: Efficient Transgenesis in bovine embryos by fertilization with androgenetic transgenic blastomeres. Otorgado por: **International Embryo Transfer Society Foundation (IETS).** Sheraton Hotel. Enero 10-12, 2010. Córdoba, Argentina.

- **2010- Reconocimiento de la Honorable Cámara de Diputados.**

Por la investigación referida a la clonación de gametos y su incidencia en la transgénesis animal como una técnica estratégica para la producción pecuaria nacional.
N° de Expediente: 1811-D-2010. Trámite Parlamentario: 028 (07/04/2010).

- **2010- Mención Especial en Investigación Aplicada 2010.**

Trabajo: “Transgénesis mediada por Microesferas Lipídicas”. Organizado por: Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva del Ministerio de Educación. INNOVAR 2010, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 17 de Diciembre, 2010.

- **2007- Premio al Mejor Trabajo en Investigación Básica:**

Trabajo: Producción de Embriones Genéticamente Modificados Mediante Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI). Otorgado por: **Sociedad Argentina de Andrología.** Academia Nacional de Medicina – Buenos Aires. 25 al 27 de Octubre, 2007.

- **2007- Premio Accésit - Investigación Básica:**

Trabajo: Clonación de Ovocitos y Producción de Hemiclones Bovinos. Otorgado por: **Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva.** Sheraton Libertador Hotel – Buenos Aires. 15 y 16 de Marzo, 2007.

-PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO

Revistas Internacionales

- **2012. DNA Fragmentation, Transgene Expression and Embryo Development after Intracytoplasmic Injection of DNA-Liposome Complexes in IVF Bovine Zygotes.** Vichera G, Moro L and Salamone D. *Zigote*. 2012 Oct 1:1-9.
- **2012. Oocyte Genome Cloning Used in Biparental Embryo Reconstruction.** Vichera G, Olivera R, Salamone D. *Zygote*. 2012, 5:1-9.
- **2011. Recent advances in micromanipulation and transgenesis in domestic mammals.** Salamone D, Bevacqua R, Pereyra Bonnet F, Gambini A, Canel N, Hiriart I, Vichera G, Moro L, Jarazo J. *Acta Scientiae Veterinariae*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2011, 39 (1):285-293.
- **2011. Sperm Genome Cloning Used in Biparental Bovine Embryo Reconstruction.** Vichera G, Olivera R, Sipowicz P, Radrizzani M, Salamone D. *Reproduction, Fertility, and Development*. 2011, 23(6):769-779.
- **2010. Efficient transgene expression in IVF and parthenogenetic bovine embryos by intracytoplasmic injection of DNA-liposome complexes.** Vichera G, Moro L and Salamone D. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011, 46(2):214-20.

Revistas Nacionales

- **2011. Clonación y Multiplicación del Genoma Espermiático aplicado en Reconstrucción de Embriones.** Vichera G, Olivera R, Sipowicz P, Radrizzani M, Salamone D. *Reproducción*. 2011, (2):11-17.
- **2007. Clonación de Ovocitos y Producción de Hemiclones bovinos.** Vichera G, Salamone D. *Reproducción*. 2007, Vol. 22 (3).

INDICE GENERAL

<u>CAPÍTULO I. Introducción General</u>	1-31
1.1. Gametogénesis	1-2
1.2. Foliculogénesis	2-4
1.3. Maduración Ovocitaria	4-5
1.4. Activación del Ovocito en la Fertilización	6-8
1.5. Activación Partenogenética del Ovocito	8-11
1.6. Regulación de la Activación del Ovocito	11-12
1.7. Producción de embriones androgénicos	12-14
1.7.1. Fertilización <i>in vitro</i>	13
1.7.2. Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides.....	13-14
1.8. Producción de Animales Transgénicos	14-22
1.8.1. Microinyección Pronuclear.....	16
1.8.2. Transferencia de genes utilizando vectores virales.....	16-17
1.8.3. Quimeras por inyección de Células madre de origen embrionario.....	17
1.8.4. Transferencia Nuclear de Células Somáticas.....	17-19
1.8.5. Transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT).....	20-22
1.9. Hipótesis	23
1.10. Objetivos	24-28
1.10.1. Objetivos Generales.....	24
1.10.2. Objetivos Específicos.....	25-28
1.10.2.1. Objetivos específicos Capítulo II.....	25-26
1.10.2.2. Objetivos específicos Capítulo III.....	26

1.10.2.3. Objetivos específicos Capítulo IV.....	26-27
1.10.2.4. Objetivos específicos Capítulo V.....	27-28
<u>CAPITULO II. Clonación y multiplicación del genoma espermático aplicado en la reconstrucción de embriones.</u>	29-62
2.1. Resumen	30
2.2. Introducción	31-33
2.3. Materiales y Métodos	33-43
2.3.1. Reactivos.....	33
2.3.2. Colección de ovocitos y maduración <i>in vitro</i>	33-34
2.3.3. Construcción de ADN exógeno.....	34
2.3.4. Incubación espermatozoides/ADN	34
2.3.5. Fertilización <i>in vitro</i>	35
2.3.6. Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide.....	35-36
2.3.7. Producción de embriones androgenéticos haploides.....	36
2.3.8. Determinación de fluorescencia en embriones.....	36
2.3.9. Análisis de cariotipo.....	37
2.3.10. Reconstrucción de embriones biparentales bovinos por fusión de blastómeras haploides androgenéticas.....	37
2.3.11. Fusión celular ZP-incluida.....	38
2.3.12. Fusión celular ZP-libre.....	38
2.3.13. Activación química.....	38-39
2.3.14. Cultivo <i>in vitro</i>	39
2.3.15. Hibridación Fluorescente in-situ (FISH).....	40-41
2.3.16. Sexado por PCR.....	41-42

2.3.17. Análisis inmunohistoquímico.....	42-43
2.3.18. Análisis estadístico.....	43
2.4. Diseño Experimental.....	44-45
2.5. Resultados.....	46-55
2.5.1. Desarrollo de embriones androgenéticos, generados por FIV previa y posteriormente a la enucleación del ovocito y utilizando espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.....	46-47
2.5.2. Desarrollo de embriones androgenéticos generados por ICSI previa y posteriormente a la enucleación del ovocito y utilizando espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.....	48-49
2.5.3. Desarrollo y expresión del gen reportero <i>egfp</i> en embriones bovinos biparentales, reconstruidos tras la fusión de blastómeras androgenéticas haploides EGFP-positivas o EGFP-negativas), con ovocitos maduros.....	49
2.5.4. Utilización de semen sexado para confirmar la incorporación del genoma masculino replicado, en los embriones reconstruidos por fusión de blastómeras androgenéticas haploides con ovocitos maduros.....	52
2.6. Discusión.....	56-62
<u>CAPITULO III. Expresión Transgénica en Embriones de Fertilización y Partenogénicos por Inyección Intracitoplasmática de complejos ADNexógeno-liposomas.....</u>	
3.1. Resumen.....	64
3.2. Introducción.....	65-67
3.3. Materiales y Métodos.....	67-72
3.3.1 Reactivos.....	67

3.3.2. Colección de ovocitos y maduración <i>in vitro</i>	67
3.3.3 Fertilización <i>in vitro</i>	67
3.3.4. Activación química del ovocito.....	68
3.3.5. Construcción de ADN.....	68
3.3.6. Coincubación de ADN y liposomas.....	68
3.3.7. Inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas.....	68
3.3.8. Incubación de ovocitos y cigotos libres de ZP con complejos ADN exógeno-liposomas.....	69
3.3.9. Cultivo in-vitro.....	69
3.3.10 Determinación de fluorescencia (EGFP) en embriones.....	69
3.3.11. Detección del transgen por PCR.....	70
3.3.12. Análisis estadístico.....	71
3.4. Diseño experimental.....	71-72
3.4.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones bovinos de FIV utilizando diferentes concentraciones de complejos <i>egfp</i> -liposomas.....	71
3.4.2. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> y en cigotos producidos por FIV.....	71-72
3.4.3. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos activados partenogénicamente.....	72
3.5. Resultados.....	73-80
3.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones de FIV utilizando diferentes concentraciones de complejos ADN exógeno-liposomas.....	73

3.5.2. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos bovinos madurados y en cigotos producidos por FIV.....	73-74
3.5.3. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos activados partenogénicamente.....	78
3.6. Discusión.....	81-84
<u>CAPITULO IV. Clonación y multiplicación del genoma de un ovocito aplicado en la reconstrucción de embriones.....</u>	85-105
4.1. Resumen.....	86
4.2. Introducción.....	87-89
4.3. Materiales y Métodos.....	89-95
4.3.1. Reactivos.....	89
4.3.2. Colección de ovocitos y maduración <i>in vitro</i>	89
4.3.3. Producción de embriones partenogénicos haploides y diploides.....	89
4.3.4. Construcción de ADN exógeno.....	89
4.3.5. Coincubación de DNA y liposomas.....	90
4.3.6. Inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas.....	90
4.3.7. Producción de hemicigotos masculinos.....	90-91
4.3.8. Análisis de cariotipo.....	91
4.3.9. Reconstrucción de embriones biparentales bovinos por fusión de blastómeras haploides partenogénicas.....	91-92
4.3.10. Cultivo.....	92
4.3.11. Determinación de fluorescencia (EGFP) en embriones.....	93

4.3.12. Determinación del número de células de los blastocistos.....	93
4.3.13. Análisis inmunohistoquímico.....	93-94
4.3.14. Transferencia embrionaria.....	94
4.3.15. Análisis estadístico.....	95
4.4. Diseño Experimental.....	95-96
4.5. Resultados.....	97-101
4.5.1. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones generados por activación partenogénica haploide, inyectados o no, con complejos pCX-EGFP-liposomas.....	97
4.5.2. Desarrollo y expresión transgénica de embriones biparentales reconstruidos por fusión de blastómeras haploides partenogénicas (expresando o no, EGFP) con hemiciotos masculinos.....	99
4.6. Discusión.....	102-105
<u>CAPITULO V. Fragmentación de ADN, Expresión Transgénica y Desarrollo Embrionario tras Inyección Intracitoplasmática de complejos ADN-Liposomas en Cigotos Bovinos de Fertilización In Vitro.....</u>	
5.1. Resumen.....	107
5.2. Introducción.....	108-109
5.3. Materiales y Métodos.....	109-113
5.3.1. Reactivos.....	109
5.3.2. Colección de ovocitos y maduración <i>in vitro</i>	109
5.3.3. Fertilización in vitro.....	109-110
5.3.4. Construcción de ADN.....	110
5.3.5. Coincubación de ADN y liposomas.....	110
5.3.6. Inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno- liposomas.....	110-111

5.3.7. Cultivo <i>in vitro</i>	111
5.3.8. Determinación de fluorescencia (EGFP) en embriones.....	111
5.3.9. Microscopía Confocal y Ensayo de TUNEL.....	111-112
5.3.10. Transferencia embrionaria.....	112
5.3.11. Extracción de ADN y análisis de PCR.....	113
5.3.12. Análisis estadístico.....	113
5.4. Diseño Experimental.....	114
5.5. Resultados.....	115-122
5.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP luego de la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en cigotos bovinos generados por FIV.....	115-117
5.5.2. Fragmentación de ADN en blastocistos bovinos generados por FIV e inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas, evaluados por ensayo TUNEL (Bd6, Bd7 y Bd8).....	118-120
5.5.3. Transferencia embrionaria, Preñeces y Nacimientos de vacas generadas por FIV.....	121-122
5.6. Discusión.....	123-126
<u>CAPITULO VI. Discusión y Conclusiones Generales.....</u>	<u>127-131</u>
6.1. Discusión y Conclusiones Generales.....	127-130
6.2. Consideraciones Futuras.....	130-131
REFERENCIAS.....	132-147

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II

- 2.5.1.** Desarrollo de embriones androgenéticos haploides y expresión de EGFP, luego de FIV con espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP en bovinos.....47
- 2.5.2.** Desarrollo de embriones androgenéticos haploides y expresión del gen reportero, luego de ICSI con espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.....50
- 2.5.3.** Desarrollo *in vitro* y expresión de EGFP de embriones reconstituidos por fusión de blastómeras androgenéticas haploides.....51

CAPÍTULO III

- 3.5.1.** Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones bovinos de FIV utilizando diferentes concentraciones de complejos *egfp*-liposomas.....75
- 3.5.2.** Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones bovinos de FIV inyectados con complejos *egfp*-liposomas.....76
- 3.5.3.** Análisis de PCR para la detección del gen exógeno *egfp* en blastocistos que desarrollaron tras ser inyectados con complejos *egfp*-liposomas.....77

3.5.4. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones partenogénéticos bovinos inyectados con complejos <i>egfp</i> -liposomas.....	79
---	----

CAPÍTULO IV

4.5.1. Desarrollo de embriones partenogénéticos haploides y expresión del transgen (<i>egfp</i>).....	98
--	----

4.5.2. Desarrollo y expresión del transgen (<i>egfp</i>) en embriones reconstruidos por fusión de hemicígotos masculinos y blastómeras partenogénéticas haploides.....	100
---	-----

CAPÍTULO V

5.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP luego de la inyección intracitoplasmática de complejos ADN-liposomas en cigotos bovinos generados por FIV.....	116
---	-----

5.5.2. Fragmentación de ADN en blastocistos bovinos generados por FIV e inyectados con complejos ADN-liposomas, evaluados por ensayo TUNEL (día 6, 7 y 8).....	119
---	-----

5.5.3. Transferencia embrionaria de blastocistos bovinos de FIV, inyectados con complejos pBCKIP2.8-Liposomas.....	122
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 2.4.1.** Diagrama explicativo de la producción de embriones androgenéticos haploides y el procedimiento de reconstrucción de embriones biparentales.....45
- Figura 2.5.1.** Reconstrucción de embriones biparentales.....53
- Figura 2.5.2.** Blastocisto bovino biparental producidos por fusión de una blastómera androgenética haploide con un ovocito maduro y cultivado en el sistema WOW.....53
- Figura 2.5.3.** Amplificación de secuencias específicas del cromosoma “Y” y del cromosoma “X” por PCR de blastómeros androgenéticos (Y) y de embriones reconstruidos (XY).....54
- Figura 2.5.4.** Fotomicrografías de hibridización fluorescente in-situ (FISH) marcando la región p12 del cromosoma Y bovino (FITC/verde) y contratinción de DNA con DAPI (azul).....55

CAPÍTULO III

- Figura 3.5.1.** Blastocisto + EGFP generado por FIV e inyección intracitoplasmática de complejos pCX-EGFP-liposomas.80
- Figura. 3.5.2.** Embriones partenogénéticos + EGFP80

CAPÍTULO IV

Figura 4.4.1. Diagrama explicativo de la producción de embriones partenogenéticos haploides y el procedimiento de reconstrucción de embriones biparentales.....96

Figura 4.5.1. Blastocisto biparental bovino producido por fusión de una blastómera haploide partenogenética con un hemicigoto masculino y cultivado en el sistema WOW.....101

Figura 4.5.2. Reconstrucción de embriones biparentales.....101

CAPÍTULO V

Figura 5.5.1. Blastocisto + EGFP generado por FIV e inyección intracitoplasmática de complejos pCX-EGFP-liposomas.....117

Figura 5.5.2. Blastocistos de día 6, 7 y 8 producidos por FIV e inyección intracitoplasmática de Complejos pCX-EGFP-liposomas, analizados por ensayo de TUNEL para determinar la presencia de fragmentación de ADN.....120

Figura 5.5.3. Crías obtenidas a partir de embriones de FIV inyectados con complejos pBCKIP2.8-liposomas.....122

ABREVIATURAS

- 1CP:** primer corpúsculo polar
- 2CP:** Segundo corpúsculo polar
- 6-DMAP:** 6-dimetilaminopurina
- AMPc:** adenosin monofosfato cíclico
- APC:** Complejo Promotor de la Anafase
- ATB:** antibiótico- antimicótico
- Bd6:** Blastocisto con 6 días de cultivo in vitro
- Bd7:** Blastocisto con 7 días de cultivo in vitro
- Bd8:** Blastocisto con 8 días de cultivo in vitro
- BO:** medio Brackett-Oliphant
- BSA:** albúmina de suero bovina
- CAK:** kinasa activadora de ciclinas
- CDK:** kinasa dependiente de ciclinas
- CHX:** Cicloheximida
- COCs:** complejo cúmulus-ovocito
- CSF:** Factores Citostáticos
- DAG:** diacilglicerol
- egfp*:** gen de la proteína verde fluorescente
- EGFP:** proteína verde fluorescente
- +EGFP:** Con expresión de EGFP
- EGFP:** Sin expresión de EGFP
- FISH:** hibridación fluorescente *in situ*
- FITC:** iso-tiocianato de fluoresceína

FIV: fertilización in vitro

FIV-Tr: transgénesis mediada por FIV

FSH: hormona folículo estimulante

HI-LC: plásmido que codifica el gen de la insulina humana acompañado con liposomas

ICSI: inyección intracitoplasmática del espermatozoide

ICSI-Tr: transgénesis mediada por ICSI

Io: ionomicina

IP3: inositoltrifosfato

LH: hormona luteinizante

MCI: macizo celular interno

MI: metafase I

MII: metafase II

MPF: Factor Promotor de la meiosis

PBS: Buffer fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PIP2: fosfoinositolbifosfato

PVA: polivinil alcohol

PVP: polivinilpirrolidona

SCNT: transferencia nuclear de células somáticas

SFB: suero fetal bovino

SMGT: Transgénesis mediada por espermatozoides

SOF: Fluido oviductal sintético

TALP-H: Tyrode's albumin lactate pyruvate buffered with HEPES

Thr 14: treonina 14

TUNEL: Sistema DeadEnd™ Fluorometric

Tyr 15: tirosina 15

UV: luz ultra violeta

WOW: Well Of the Well

ZP: zona pelúcida

RESUMEN**CLONACIÓN DE GAMETAS Y TRANSGÉNESIS MEDIADA POR FERTILIZACIÓN IN-VITRO EN BOVINOS**

En la presente tesis se desarrolló un método de clonación del genoma del espermatozoide y del ovocito bovino mediante la producción de embriones androgenéticos y partenogénicos haploides. Esta técnica también fue utilizada para generar embriones bovinos que expresan un gen exógeno (transgén) en forma homogénea. Las tasas de desarrollo de los embriones reconstruidos utilizando genomas espermáticos clonados (blastómeras androgenéticas), alcanzaron 85.1% de clivaje, 9% de blastocistos y todos los embriones expresaron el transgen (EGFP) durante el desarrollo *in-vitro*. Las tasas de clivaje y de blastocistos de los embriones reconstruidos utilizando genomas clonados de ovocitos (blastómeras partenogénicas), alcanzaron 78.4% y 10.8% respectivamente. Todos los embriones reconstruidos utilizando blastómeras partenogénicas que expresaban el transgen mostraron expresión de EGFP y el 96.6% de ellos en forma homogénea. Posteriormente se desarrolló un nuevo método de transgénesis que permite transfectar cigotos de fertilización *in vitro* (FIV) y ovocitos activados partenogénicamente (AP). El 70% de los embriones clivados y el 50% de los blastocistos expresaron EGFP cuando complejos pCX-EGFP-liposomas fueron inyectados 16 h post-fertilización y utilizando una concentración de 500 ng ADN exógeno/ μ l. Al inyectar ovocitos 3 h post-activación partenogénica se obtuvo una tasa de expresión de 48.4%. Por otro lado, evaluamos la incidencia de fragmentación del ADN tras la inyección del transgen, demostrando que su expresión afecta la integridad del ADN en blastocistos bovinos de FIV, pero no así las tasas de desarrollo *in vitro*. En resumen, la presente tesis conforma una base sólida para concluir que es posible la clonación de genomas de ovocitos y espermatozoides con capacidad de generar embriones biparentales que evolucionan hasta estadio de blastocisto. Además, este procedimiento demostró ser una herramienta eficiente para la incorporación de genes exógenos en un embrión. Finalmente se demostró que la inyección intracitoplasmática de liposomas es una estrategia eficiente para introducir ADN exógeno en embriones de FIV y AP.

Palabras claves: Clonación, Espermatozoide, Ovocito, Androgenético, Partenogénico, Transgenesis, FIV, Bovino.

ABSTRACT**GAMETE CLONING AND IVF-MEDIATED TRANSGENESIS IN BOVINE**

In this thesis we developed a method to clone the spermatozoon and oocyte genomes in bovine, by the production of androgenetic and parthenogenetic haploid embryos. This technique was also used to generate bovine embryos that express an exogenous gene (transgene) homogeneously. Developmental rates of embryos reconstructed with cloned sperm genomes (androgenetic blastomeres), reached 85.1% of cleavage, 9% of blastocysts and all embryos expressed the transgene (EGFP) during in vitro development. Cleavage and blastocyst rates of embryos reconstructed with cloned oocyte genomes (parthenogenetic blastomeres) were 78.4% and 10.8%, respectively. All embryos reconstructed with transgenic parthenogenetic blastomeres showed EGFP expression, and 96.6% of them were homogenous. Subsequently, we developed a new method to transfect in vitro fertilized embryos (IVF) and parthenogenetically activated oocytes (PA). Nearly 70% of cleaved embryos and 50% of blastocysts expressed EGFP when pCX-EGFP-liposome complexes were injected 16 h post fertilization, using 500ng of exogenous DNA/ul. After injecting oocytes 3 h post parthenogenetic activation we obtained 48.4% of expressing embryos. Moreover, we evaluated DNA fragmentation after transgene injection and we demonstrated that its expression affects DNA integrity in IVF bovine blastocysts, but not in vitro development. In summary, this thesis is solid enough to conclude that it is possible to clone the sperm and oocyte genomes with the capacity to generate biparental embryos until the blastocyst stage. In addition, this procedure resulted to be an efficient tool to transfect embryos with exogenous genes. Finally, we demonstrated that it is possible to produce IVF and PA embryos with transgene expression, by intracytoplasmic injection of liposomes with exogenous DNA.

Key Words: Cloning, Spermatozoon, Oocyte, Androgenetic, Parthenogenetic, Transgenesis, IVF, Bovine.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la presente tesis se desarrolló un método de clonación del genoma del espermatozoide y del ovocito bovino mediante la producción de embriones androgenéticos y partenogenéticos haploides. Esta técnica también fue utilizada para la producción de embriones bovinos que expresan un gen exógeno (transgén) en forma homogénea. Posteriormente se desarrolló un nuevo método de transgénesis que permite transfectar cigotos de fertilización *in vitro* (FIV) y ovocitos activados partenogenéticamente. Para una comprensión más profunda de los diferentes experimentos que se llevaron a cabo, se hará una revisión teórica de procesos biológicos relevantes para esta tesis.

1.1. GAMETOGÉNESIS

La gametogénesis es el proceso mediante el cual las células germinales diploides (ovogónias en la hembra o espermatogónias en el macho), dan lugar a la formación de gametas haploides. Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales se diferencian a partir del epitelio del saco vitelino, migran a través del mesenterio y colonizan las gónadas primitivas del mesonefro. Luego se conectan unas a otras por puentes intercelulares y finalmente se diferencian en ovogónias o espermatogónias según el sexo del individuo. En mamíferos, dicho proceso presenta ciertas particularidades para cada uno de los dos sexos.

La gametogénesis masculina o espermatogénesis comienza con las espermatogónias, las cuales se dividen por mitosis en forma continua sólo a partir de la pubertad, como respuesta al aumento de los niveles de las gonadotrofinas conocidas como hormona luteinizante (LH)

y hormona folículo estimulante (FSH). Esta renovación constante de células germinales es la que hace posible la producción permanente de espermatozoides durante toda la vida adulta del macho. Como resultado de procesos de diferenciación y meiosis, cada espermatogonia genera 4 gametas masculinas haploides, conocidas con el nombre de espermatozoides.

La gametogénesis femenina u ovogénesis comienza durante la vida fetal y termina durante la madurez sexual del individuo adulto. Los ovocitos se originan a partir de células primordiales germinales de origen embrionario endodérmico y migran hacia el tejido gonadal a los 35 días de gestación (Erickson y col., 1966). Estas células primordiales sufren una serie de divisiones mitóticas durante la migración hasta su llegada al ovario fetal primitivo (Smitz y col., 2002), momento en que se las denomina ovogonias. Las ovogonias inician la meiosis a los 75-80 días de gestación pero ésta se detiene en la etapa de profase I, momento en el cual el material genético se encuentra descondensado dentro de la membrana nuclear formando lo que se conoce como vesícula germinal (Erickson y col., 1966).

1.2. FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es un proceso mediante el cual los folículos ováricos sufren cambios morfológicos, acompañados por cambios en los ovocitos. En primer lugar, una capa delgada de células epiteliales se condensa alrededor de los ovocitos formando los folículos primordiales. Los ovocitos que no logren incluirse dentro de esta estructura de células epiteliales degeneran. A partir de allí, el folículo comienza a crecer y las células aplanadas de la pre-granulosa presentes en el folículo primordial se transforman en células de la

granulosa con morfología cuboidal. De esta manera el folículo primordial se transforma en folículo primario. La proliferación de las células de la granulosa resulta en un aumento de las capas alrededor del ovocito (entre dos y seis capas), siendo este momento cuando el folículo pasa de ser folículo primario a folículo secundario (Adams y col., 2008). Durante este período, las células de la granulosa se encuentran estratificadas y ocurre la diferenciación de las células del estroma ovárico que rodean al folículo, con la aparición de la teca, formada por la capa interna y la externa. La teca se vasculariza, lo que permite el acceso de las gonadotrofinas al folículo en crecimiento. Además, el ovocito aumenta de tamaño y se forma la zona pelúcida (ZP), una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos de mamíferos (Eppig y col., 2001). Cuando las capas de las células de la granulosa alrededor del ovocito superan las seis y el folículo se llena de fluido (antro), éste pasa a denominarse folículo terciario o antral (Adams y col., 2008), el cual es dependiente de gonadotrofinas. El desarrollo de los folículos antrales generan los folículos de De Graaf, que luego del pico de gonadotrofina preovulatoria pasan a denominarse folículos preovulatorios (Eppig y col., 2001). Durante la foliculogénesis el ovocito se desarrolla y se vuelve competente, es decir, adquiere la habilidad de reasumir y completar la meiosis y de sobrellevar el desarrollo embrionario pre-implantatorio. Estos cambios en el ovocito están regulados por mecanismos endócrinos e intraováricos, los cuales promueven y coordinan el crecimiento (Fiona y col., 2006). En folículos pre-antrales los ovocitos son incapaces de progresar más allá de la profase I, o sea que son meióticamente incompetentes por no tener las moléculas regulatorias necesarias para progresar en la meiosis. Sin embargo, los ovocitos en folículos antrales sí poseen esta capacidad (Eppig y col., 2001). La formación del antro genera otros cambios importantes en los ovocitos. En este período las células de la granulosa se diferencian en dos grupos principales, las células del cúmulus las cuales están

asociadas al ovocito formando el complejo cúmulus-ovocito (COCs) y las células de la granulosa murales en la pared folicular (Eppig y col., 2001).

No todos los folículos primordiales que se formaron en un principio llegan a la fase ovulatoria. Existen ondas de crecimiento folicular donde los folículos se transforman en dominantes y otros en subordinados. Mediante un proceso de selección, varios folículos alcanzan la dominancia y sólo uno adquiere la capacidad ovulatoria, mientras que los otros sufren atresia (Adams y col., 2008). La regulación de la actividad ovárica es un proceso integrado que incluye señales extraováricas y factores intrafoliculares. El crecimiento del folículo primordial puede iniciarse y transcurrir sus primeras etapas en ausencia de gonadotrofinas, aunque la hormona FSH afecta el crecimiento del folículo pre-antral. En cuanto al desarrollo del folículo antral, éste es totalmente dependiente de gonadotrofinas. A medida que el folículo continúa su maduración, pasa de ser FSH dependiente a ser LH dependiente (Webb y col., 2004).

1.3. MADURACIÓN OVOCITARIA

Con el desarrollo de los folículos antrales, tiene lugar un cambio drástico en el núcleo de los ovocitos, hasta ahora arrestados en diplotene de la meiosis I. Los ovocitos adquieren en primer lugar, la capacidad de romper la vesícula germinal y luego la capacidad de continuar la meiosis hasta el estadio de metafase I (MI) y finalmente, tras la segregación de los cromosomas homólogos y liberación del primer corpúsculo polar (ICP), continuar la meiosis hasta el estadio de metafase II (MII).

En el momento de la formación del antro y diferenciación de las células del cúmulus, el ovocito crece hasta su tamaño definitivo pero se mantiene arrestado en profase I, y son las células foliculares las responsables de este control (Mehlmann y col., 2005). La inducción a la maduración involucra la interacción de factores intracelulares, parácrinos y estructurales que incluyen esteroides, esteroides, factores de crecimiento, adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y uniones gap (Jamnongjit y col., 2005). Además, es importante un pico de LH en la etapa preovulatoria; esta gonadotropina actúa sobre las células de la granulosa pero la señal es transducida dentro del ovocito como un cambio en las moléculas de señalización, lo que provoca la reanudación de la meiosis (Mehlmann y col., 2005). La continuación de la meiosis se manifiesta con la ruptura de la membrana de la vesícula germinal, seguido por la condensación de los cromosomas y ensamblaje del huso de la MI, segregación de los cromosomas homólogos y terminación de la primera división meiótica (Liang y col., 2007). Luego, la meiosis se mantiene nuevamente arrestada en estadio de MII hasta el momento de la fertilización (Sirard y col., 1989). Entonces, un ovocito que ha completado su maduración nuclear es aquel que ha concretado la extrusión del 1CP y sus cromosomas se encuentran condensados en metafase. La adquisición de la maduración citoplasmática implica cambios morfológicos como reducción del tamaño del aparato de Golgi, aumento del contenido lipídico, localización de los gránulos corticales y aumento del espacio perivitelino. También ocurren cambios bioquímicos que involucran la regulación temporal de la acumulación, la poliadenilación, la traducción o la degradación de ARN mensajeros.

1.4. ACTIVACIÓN DEL OVOCITO EN LA FERTILIZACIÓN

La activación de un ovocito detenido en MII, es un proceso iniciado en forma natural con la fusión del espermatozoide. Este fenómeno induce una serie de oscilaciones de Ca^{+2} intracelular (Fissore y col., 1992), que desencadena el reinicio y la conclusión de la meiosis. Esta se caracteriza por una secuencia ordenada de eventos que incluye la exocitosis de los gránulos corticales, la extrusión del segundo corpúsculo polar (2CP), la formación de los pronúcleos y la progresión hacia la interfase.

Previamente a la fecundación se produce un arresto meiótico debido a los elevados niveles del factor promotor de la meiosis (MPF) activo, el cual se mantiene en esta conformación por la presencia de los “Factores Citostáticos” (CSF) que impiden la degradación de la ciclina B (Williams., 2002) por parte del complejo promotor de la anafase (APC; Madgwick y col., 2007). Los CSF corresponden a moléculas inhibitoras del APC y uno de los candidatos mejor descritos en mamíferos es MOS, activador de MAPKK. Poco tiempo después de la fusión del espermatozoide, la elevación citoplasmática de Ca^{+2} induce la degradación de ciclinas y de MOS por parte del proteosoma. De este modo, al perderse los CSF e inactivarse MPF, el ovocito puede continuar con la anafase.

Otra proteína importante en la regulación de la meiosis es MAPK. Esta quinasa es la encargada de fosforilar proteínas cromosomales importantes para el mantenimiento del estado de condensación adecuado durante la transición de la meiosis I a la meiosis II, y también, de prevenir la formación de la envoltura nuclear (Murray y Hunt., 1993). Durante la activación ovocitaria, la actividad de MAPK comienza a disminuir luego de la reducción

de los niveles de MPF activo, y es necesaria antes de la formación de los pronúcleos (Moos y col., 1995).

Recientemente se han obtenido grandes avances en la comprensión del mecanismo por el cual el espermatozoide inicia la activación del ovocito, debido a que se ha identificado en ratones al factor espermático involucrado en la liberación intracelular de Ca^{+2} . Este factor es una isoforma de la Fosfolipasa C específica de espermatozoides denominada PLC Z (Saunders y col., 2002). El modo de acción de la PLC Z consiste en la producción de inositoltrifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) tras la hidrólisis de fosfoinositolbifosfato (PIP2). La producción de DAG está involucrada en el influjo de Ca^{+2} vía activación de proteína Kinasa C (Halet y col., 2004). IP3 promueve la liberación de Ca^{+2} uniéndose a receptores específicos y activando canales de Ca^{+2} localizados en la membrana del retículo endoplásmico, el cual es un reservorio de Ca^{+2} en la célula (Miyazaki y col., 1992). Estos receptores a su vez se regulan por la concentración citosólica de Ca^{+2} . Así, cuando la concentración es baja, se induce la apertura de estos reservorios y el sistema se retroalimenta de manera positiva; en tanto, al alcanzar una concentración elevada, estos compartimientos se cierran y el Ca^{+2} es retenido nuevamente en el retículo endoplasmático volviendo al nivel catiónico basal. De esta manera, alternando estos mecanismos de retroalimentación, se producen las repetitivas oscilaciones anteriormente descritas (Williams y col., 2002).

La concentración de Ca^{+2} se eleva primero en el sitio de contacto y progresa en forma de ola expansiva a través del citoplasma. En mamíferos las oscilaciones de Ca^{+2} pueden durar horas y específicamente en bovinos se ha visto la progresión de las oscilaciones por 22 hs

con una disminución en la amplitud de las mismas a las 12-15 h (Alberio y col., 2001). Un efecto inmediato de las oscilaciones de Ca^{+2} es la exocitosis de los gránulos corticales, los cuales se ubican próximos a la membrana plasmática del ovocito. Estos gránulos contienen enzimas que son liberadas al espacio perivitelino y modifican la composición de la ZP, evitando de esta forma el ingreso de otro espermatozoide y por ende la poliespermia (Williams y col., 2002).

1.5. ACTIVACIÓN PARTENOGENÉTICA DEL OVOCITO

La partenogénesis se define como el fenómeno biológico por el cual se da inicio al desarrollo embrionario a partir de una gameta femenina activada, sin contribución genética masculina. La partenogénesis puede ser inducida experimentalmente en mamíferos mediante una gran variedad de estímulos, muchos de los cuales producen activación, clivaje y desarrollo de blastocistos aparentemente normales (Paffoni A. y col., 2008). De todos modos, los embriones partenogenéticos generados carecen de capacidad de desarrollo a término (Vrana, 2003).

Respecto a los usos de la activación partenogenética, podemos mencionar que constituye una herramienta para el estudio de los eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario temprano y los fenómenos de impronta genómica. Por otra parte, su aplicación resulta esencial para llevar a cabo técnicas reproductivas tales como la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) o la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) en especies domésticas, incluyendo al bovino. Los procedimientos utilizados actualmente para la activación de ovocitos detenidos en MII incluyen estímulos físicos y químicos (Liu y col., 1998).

Debido a que las oscilaciones de calcio provocadas por la fertilización constituyen la clave para la reanudación de la meiosis, los ovocitos bovinos, al igual que los de otros mamíferos, pueden ser activados partenogenéticamente mediante algún estímulo que eleve los niveles de Ca^{+2} intracelulares. Los agentes químicos más utilizados capaces de producir este efecto son el estroncio, el etanol y los ionóforos de calcio. La ionomicina (Io) es un tipo de ionóforo de calcio muy utilizado en protocolos de transferencia nuclear que provoca la salida de este mensajero de los reservorios celulares induciendo un único pico de Ca^{+2} en el ovocito (Alberio y col., 2001). De todas formas, algunos autores observaron que la Io por sí sola es capaz de provocar la salida del arresto meiótico, pero no la formación de los pronúcleos en esta especie. En su lugar se observa un nuevo arresto en el estadio de metafase III (MIII; Kubiak y col., 1993; Susko-Parrish y col., 1994). Esto se debe a que la inducción de una única liberación de calcio puede causar la inactivación temporaria de MPF, pero resulta necesaria la destrucción o inhibición de las ciclinas que se sintetizan de novo para mantener el estado inactivo de este factor. Es por eso que muchos protocolos de activación combinan este compuesto con inhibidores de la síntesis de proteínas, como la cicloheximida, o lo que resulta aún más específico, con inhibidores de la fosforilación de proteínas quinasas, como el 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; Szöllösi y col., 1993).

La cicloheximida (CHX) es un inhibidor general de la síntesis proteica, que utilizada por un periodo de 2-5 hs posterior a un pulso de oscilación de Ca^{+2} , induce activación y formación de pronucleos (Presicce y Yang., 1994). El efecto de la CHX es la inhibición de la producción de ciclina B, componente del MPF, así como de otras proteínas de vida corta.

De esta manera se inhibe la actividad del MPF y los cromosomas decondensan dando lugar a la formación de un pronúcleo.

El inhibidor de la fosforilación de proteínas kinasas 6-DMAP, demostró ser también eficaz en la activación de ovocitos bovinos jóvenes. Esta sustancia utilizada en ovocitos bovinos por periodo de 3-4 hs posterior a un pulso de Ca^{+2} , permite lograr porcentajes de activación y formación de pronucleos superiores a los obtenidos con Cicloheximida, aunque un menor desarrollo fue obtenido después de la activación de ovocitos clonados con blastómeros (Booth y col., 2001). Esta sustancia prevendría la reactivación del MPF indirectamente a partir de la inhibición de la fosforilación de c-Mos y MAPK, así como a partir de la inhibición de la fosfatasa cdc25 encargada de llevar a cabo la activación del MPF (Alberio y col., 2001). Sin embargo, el 6-DMAP no induce activación cuando es utilizado sin previo incremento del Ca^{+2} (Moses y Masui., 1995). Otros autores adjudican al 6-DMAP, una acción directa sobre la kinasa dependiente de ciclinas (CDK), componente del MPF, produciendo una fosforilación en uno de sus sitios inhibidores. (Liu y Yang., 1999).

La exposición a CHX posterior a un pulso de Ca^{+2} muestra una dinámica de inactivación del MPF, similar a la observada después de la fertilización (Liu y Yang., 1999). El intervalo entre la inactivación del MPF y MAPK es similar en ambos grupos. Por otra parte estos embriones extruyen el 2CP. Cuando se utiliza la combinación de un elevador del flujo de Ca^{+2} y 6-DMAP, la actividad del MPF declina abruptamente, tan pronto como una media hora después de la inducción del flujo de Ca^{+2} y la de MAPK disminuye recién a las 3-4 hs después de la activación. Este intervalo entre la disminución de la actividad del MPF y MAPK es menor que lo observado durante la fertilización o la activación con CHX (Liu y

Yang., 1999). Se ha propuesto la utilización de inhibidores naturales de CDK para inducir activación en ovocitos maduros (Motlik y col., 1998). La Roscovitina es una purina que posee una actividad inhibitoria específica de las CDK, suprimiendo de esta forma la actividad del MPF, debido a que presumiblemente bloquea la unión de adenosin trifosfato al sitio activador de la CDK (Meijer y col., 1997; Noble y col., 2004).

1.6. REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL OVOCITO

Durante la maduración del ovocito, el MPF aumenta en concentración alcanzando su máximo durante el estadio de MII. Para ejercer su actividad kinasa, el complejo es sometido a una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones realizadas por otras kinasas.

La kinasa activadora de ciclinas (CAK) fosforila a CDK en el sitio correspondiente al aminoácido treonina 161 (Thr 161). Posteriormente otras kinasas, la Wee-1 y la Myt-1, fosforilan a CDK en el sitio correspondiente al aminoácido tirosina 15 (Tyr 15) y treonina 14 (Thr 14), respectivamente. En este momento el complejo es llamado pre-MPF y se encuentra inactivado. A medida que la concentración de pre-MPF aumenta, se produce la activación del mismo a partir de una fosfatasa llamada cdc 25, la cual desfosforila a Thr 14 y a Tyr 15.

La activación del MPF se autorregula por un proceso de retroalimentación positivo a partir de las moléculas de MPF activas que se incrementan en el ovocito. Por esto, aún no queda claro si el inicio de la activación de CDK está dado por el efecto de activación de cdc25 o bien porque CDK activa a cdc25. Antes de entrar a fase M, la fosfatasa cdc25 y la kinasa Myt-1 son hiperfosforiladas convirtiéndose la primera en la forma activa y funcional y la segunda en la forma inactiva (Mueller y col., 1995).

El aumento del Ca^{+2} durante la fecundación activa a la proteína quinasa II Ca^{+2} / calmodulina dependiente, la cual ejerce una regulación dual sobre el MPF. Por un lado activa el complejo promotor de la anafase (APC), una E3 ubiquitina ligasa que destruye la ciclina B de forma proteosoma-dependiente y consecuentemente la ciclina B se poliubiquitina y se degrada vía proteosoma. Por otro lado, también promueve la fosforilación de un único sitio inhibitorio de la fosfatasa Cdc25, inhibiendo de esta manera la reactivación del MPF. Esta fosforilación inhibitoria es ejercida por múltiples proteínas kinasas tales como la proteína quinasa A (Hutchins., 2003).

1.7. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES ANDROGENÉTICOS

Los embriones androgenéticos son embriones que poseen únicamente genoma de origen paterno (Barton y col., 1984; Miki y col., 2009). Diferentes métodos han sido utilizados para la producción de embriones androgenéticos incluyendo: 1) remoción del pronúcleo femenino de cigotos. (Barton y col., 1984; McGrath y Solter 1984; Surani y col., 1984; Kaufman y col., 1989; Latham y Solter, 1991; Hagemann y col., 1992), 2) fertilización de ovocitos enucleados (McGrath y Solter, 1984; Surani y col., 1984; Kaufman y col., 1989; Latham y Solter, 1991; Hagemann y col., 1992; Obata y col., 2000) e 3) inyección de espermatozoides dentro de ovocitos, seguida de remoción de cromosomas maternos (Miki y col., 2009). Estos métodos han sido exitosamente aplicados en el ratón pero poco estudiados en animales de granja (Lagutina y col., 2004; Matsukawa y col., 2007; Park y col., 2009). La producción de embriones androgenéticos involucra la utilización de técnicas de reproducción asistida como la fertilización in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en combinación con la remoción del material genético de origen materno.

1.7.1. Fertilización *in vitro*

La FIV ha sido definida como la penetración de espermatozoides capacitados en ovocitos maduros fuera del tracto genital femenino. La FIV promueve la extrusión del 2CP y la formación de los pronúcleos masculino y femenino y el proceso culmina con la singamia (unión de ambos pronúcleos) que restablece la euploidía. La producción de embriones *in vitro* es de gran utilidad para investigación básica, tratamiento de infertilidad humana e incremento de productividad en animales de granja. La habilidad de imitar exitosamente este proceso biológico en el laboratorio está basada en años de estudio y experimentación. La primera FIV se realizó utilizando ovocitos de conejo y espermatozoides recuperados de útero (Dauzier y col., 1954; Thibault y col., 1954). En 1981, se obtuvo el primer bovino por FIV, utilizando ovocitos madurados *in vivo* recuperados quirúrgicamente (Brackett y col., 1982).

1.7.2. Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides

La 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 evaden fases que son fundamentales en el proceso de la fertilización, como son la unión del espermatozoide a la ZP 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 (Uehara y Yanagimachi, 1976), antes de conseguir fertilización mediante ICSI en el hombre (Palermo y col., 1992). Sin embargo, la aplicación en las especies domésticas tales como la vaca, el caballo o el cerdo, no han avanzado en la misma medida.

La ICSI es de mucha utilidad en la producción de animales de granja de un sexo determinado (Probst y 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 equipamientos complejos, personal preparado y un efectivo protocolo de trabajo. 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 y Yanagimachi, 1976). Las primeras investigaciones de esta técnica en animales de interés zootécnico (Catt y 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 y col., lo consiguieron en 1995. En bovino, Goto y col. (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 y col., 1997).

1.8. PRODUCCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

La transgénesis es una potente herramienta biotecnológica para la generación de animales modificados genéticamente con aplicaciones en diversas áreas como producción agropecuaria, biomedicina y producción farmacéutica. Los animales transgénicos se pueden

utilizar para diferentes propósitos como la obtención de proteínas farmacológicas recombinantes, órganos para xenotransplantes, estudiar patologías humanas o mejorar de la producción animal.

Un animal transgénico es aquel en el que se ha modificado la información genética de forma intencionada, mediante la introducción de nueva información o por la supresión dirigida de información existente (Wall., 1996). La transgénesis 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.

Los primeros animales transgénicos fueron producidos por Gordon y Ruddle (1981) mediante microinyección pronuclear. Estos autores generaron ratones con crecimiento desmedido mediante la introducción del transgén que codificaba la hormona del crecimiento humano en cigotos. A mediados de los años 80 y durante la década de los 90 se aplicó esta tecnología para obtener animales transgénicos de granja incluyendo conejos, ovejas y cerdos (Hammer y col., 1985), vacas y cabras (Pursel y 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 generaron los primeros animales transgénicos de granja (Hammer y col., 1985), una gran variedad de métodos se han ido desarrollando para la producción de animales transgénicos (Wall 2001, 2002). Entre las que se destacan: microinyección directa de ADN exógeno en el pronúcleo de ovocitos fecundados, transferencia nuclear utilizando células somáticas modificadas como donantes de núcleo, espermatozoides como vectores,

células madre de origen embrionario, electroporación, liposomas y el empleo de vectores virales para la introducción de ADN exógeno en los embriones (Kues y Niemann, 2004).

1.8.1. Microinyección Pronuclear

Mediante esta técnica, Gordon y Ruddle (1981) generaron el primer animal transgénico microinyectando genes directamente en el pronúcleo de ovocitos de ratón recién fecundados. Esta técnica ha sido la más utilizada y con más posibilidades de éxito en la producción de ratones transgénicos. Sin embargo presenta una serie de limitaciones como: ineficiencia en la producción de embriones en los cuales el ADN inyectado fue integrado en el genoma hospedador (Nottle y col., 2001), producción de embriones transgénicos mosaicos para el número de copias del transgen (Keefe, 2004), y además el sitio de integración del transgén es impredecible, resultando en una variación de la expresión del transgén (Clark y col., 1994).

1.8.2. Transferencia de genes utilizando vectores virales

Una alternativa a la microinyección pronuclear es el uso de retrovirus o lentivirus que inserten genes exógenos en su genoma. El retrovirus actúa como un sistema natural de transferencia de ADN en varios tipos de células (Varmus, 1998). Esta transferencia puede llevarse a cabo mediante la exposición de las células a una alta concentración de virus, por cocultivo en monocapa de células infectadas con retrovirus.

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 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 transgen.

1.8.3. Quimeras por inyección de Células madre de origen embrionario

Las células embrionarias indiferenciadas (Embryonic stem Cells) se establecen 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 (Wagner y col., 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 formando la línea germinativa originando un animal quimérico con células portadoras del gen exógeno (Robertson y col., 1986). La posibilidad de una selección previa de un genotipo en particular antes de la introducción de las células en el embrión constituye la principal ventaja de esta técnica. Sin embargo, un 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 y Rexroad 1993b). Con esta técnica se han producido animales transgénicos en diferentes especies entre las que destacamos bovinos transgénicos quiméricos (Cibelli y col., 1998b).

1.8.4. Transferencia Nuclear de Células Somáticas

La técnica de SCNT consiste en la transferencia de material genético de una célula donante (carioplasto) a un citoplasto receptor. En animales domésticos se utiliza como citoplasto, el

citoplasma de ovocitos madurados o *in vivo*, mientras el carioplasto puede ser células adultas diferenciadas, células embrionarias o células fetales, las cuales pueden ser genéticamente modificadas en cultivo. 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.

Esta técnica es utilizada para la producción de animales genéticamente iguales a los donantes llamados clones. Esta técnica presenta una serie de ventajas: debido a que las células donantes de núcleos pueden ser cultivadas durante periodos de tiempo prolongados, las dificultades asociadas a la inserción al azar de los genes pueden ser eliminadas mediante la selección de líneas celulares adecuadas; permite el uso de un amplio rango de células como son líneas celulares embrionarias, células fetales y células somáticas adultas (Van Reenen y col., 2001). Permite crear modelos biológicos, con eliminación de genes (knock out) para el estudio de enfermedades animales y humanas.

Una variante de esta técnica es la transferencia de ADN en las células somáticas, utilizadas para la generación de animales transgénicos por clonación, siendo esta técnica mucho más eficaz que la microinyección pronuclear para obtener animales de granja transgénicos (Schnieke y col., 1997; Cibelli y col., 1998a).

La introducción de copias de ADN en células somáticas puede realizarse 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 y col., 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 interactuar 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 para la transferencia genética en diferentes tejidos, como corazón (Aleksic y col., 1997), páncreas (Benhamou y col., 1997).

Otro método para la introducción de copias de ADN en células somáticas es la 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 y col., 1986). Entre sus ventajas encontramos la facilidad y repetitividad y la aplicación a células en crecimiento en capas o en suspensión. La electroporación ha sido utilizada en espermatozoides de bovino (Gagné y col., 1991) y porcino (Horan y col., 1992). Estos llevarían el ADN exógeno al interior del ovocito durante la fecundación (Gagné y col., 1991; Horan y col., 1992) y en líneas embrionarias indiferenciadas de ratón han dado lugar a ratones transgénicos (Camper y col., 1995).

1.8.5. Transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT)

Diversas son las técnicas reproductivas que se han llevado a cabo para la obtención de embriones y animales transgénicos mediante SMGT. Entre ellas encontramos la FIV, la ICSI, la inseminación artificial, la inseminación quirúrgica laparoscópica, etc.

En 1989 se obtuvieron F1 de ratones transgénicos producidos por FIV de ovocitos con espermatozoides epididimarios incubados con plásmidos (Lavitrano y col., 1989). También se ha reportado la utilización de semen congelado sometido a electroporación y coincubado con proteína verde fluorescente (EGFP) con el promotor β -actina (Rieth y col., 2000). En este estudio se realizó FIV en bovinos con ovocitos de maduración, y de los 29 embriones obtenidos y analizados, solo uno resultó ser transgénico. Gagné y col. (1991) y Sperandio y col. (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 y col. (2000). Sin embargo, ellos no reflejan la integración del transgén sino la presencia de algunas copias del plásmido y no se observó expresión de EGFP en ninguno de los embriones.

El uso de protaminas unidas al transgén para protegerlo de la lisis de las nucleasas fue realizado por Alderson y col. (2006). Estos autores realizaron FIV en bovino con dos tipos de plásmidos (pCX-EGFP y pCX-EGFP-protaminas). El análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mostró que los blastocistos tenían incluido el plásmido, 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.

El primer trabajo de transferencia de genes mediada por ICSI fue el de Perry y col. (1999), llevando a cabo con éxito 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.

En otro estudio (Naruse y col., 2005), introduce el gen de la albúmina humana recombinante asociado al gen EGFP como marcador de aquellos ratones y cerdos que fueran transgénicos. En este estudio se utilizó 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, las tasas de división embrionaria temprana y de blastocistos son similares a los obtenidos por microinyección pronuclear, pero la proporción de blastocistos que expresan la EGFP es significativamente mayor en el grupo de la SMGT. Moreira y col. (2004) demuestra la capacidad de transferir, por este sistema, ADN de gran tamaño y con una mayor eficiencia que la microinyección pronuclear.

Con la técnica de ICSI-SMGT se han obtenido los primeros monos transgénicos mediante la transferencia de estos embriones (Chan y col., 2000). La expresión de EGFP solo se observó en embriones creados por ICSI y no por FIV. En la especie porcina, Shim y col. (2000) y Lee y col. (2003) obtienen mediante ICSI embriones transgénicos, utilizando espermatozoides con membranas dañadas ya sea de manera química o física. En el año 2008 nuestro grupo obtiene embriones bovinos que expresaron EGFP mediante la técnica de ICSI-SMGT (Pereyra-Bonnet y col., 2008).

1.9. HIPÓTESIS

Para el desarrollo de este trabajo nos planteamos las siguientes hipótesis:

1. Mediante la producción de embriones androgenéticos y partenogenéticos, es posible replicar genomas haploides a partir de un único espermatozoide y de un único ovocito bovino y estas réplicas pueden ser utilizadas para reconstruir embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto.
2. La inyección de complejos ADN exógeno-liposomas directamente en el citoplasma de ovocitos y cigotos, permite generar embriones de FIV y de activación partenogenética que expresen un transgén.

1.10. OBJETIVOS

1.10.1. Objetivos Generales

- Estudiar el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos reconstruidos por transferencia nuclear, empleando genomas bovinos clonados (femeninos o masculinos) como donantes de núcleo y utilizando como recipientes, hem cigotos masculinos u ovocitos madurados *in vitro*. Esto nos permitirá establecer una nueva y ventajosa forma de generar embriones con una nueva combinación de características genéticas a partir de ambos progenitores, y de forma similar a una fertilización. También nos permitirá seleccionar el sexo y ciertos atributos favorables en forma previa a la formación del embrión.
- Generar mediante la utilización de gametas bovinas clonadas, embriones biparentales transgénicos que expresen un gen exógeno en forma homogénea, reduciendo las tasas de mosaicismo y multiplicando el número de animales transgénicos generados a partir de una sola gameta.
- Desarrollar un nuevo método de transgénesis por FIV que aumente la eficiencia de producción de embriones transgénicos en la especie bovina, con el objetivo de simplificar la producción de animales genéticamente modificados.

1.10.2. Objetivos Específicos

1.10.2.1. Objetivos específicos Capítulo II

- Producir embriones androgenéticos haploides, empleando cuatro métodos diferentes:
 - a) FIV de ovocitos enucleados.
 - b) Enucleación de ovocitos fertilizados.
 - c) ICSI en ovocitos enucleados.
 - d) Enucleación de ovocitos fertilizados por ICSI.Producir embriones androgenéticos haploides nos permitirá obtener múltiples células con núcleos idénticos al de un espermatozoide.

- Determinar la capacidad de desarrollo de embriones bovinos biparentales producidos por transferencia nuclear de blastómeras androgenéticas haploides en ovocitos madurados *in vitro*.

- Determinar el sexo de las blastómeras androgenéticas haploides dadoras de núcleo masculino y de los embriones biparentales producidos con ellas, empleando PCR e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). De esta forma se establecerá una nueva y ventajosa forma de seleccionar el sexo de los embriones resultantes.

- Producir embriones androgenéticos haploides que expresen el gen exógeno *egfp*, mediante SMGT.

- Determinar la capacidad de desarrollo y de expresión transgénica de embriones bovinos biparentales producidos por transferencia nuclear de blastómeras androgenéticas haploides

que expresen el gen exógeno *egfp* en ovocitos madurados. Esto nos permitirá obtener embriones biparentales bovinos que expresen un gen exógeno en forma homogénea.

1.10.2.2. Objetivos específicos Capítulo III

- Evaluar la expresión de EGFP y el desarrollo de embriones generados por fertilización (FIV) tras ser inyectados con diferentes concentraciones de ADN exógeno.
- Evaluar la expresión de EGFP y el desarrollo de los embriones, tras ser inyectados con ADN exógeno en forma previa y posterior a la FIV.
- Evaluar la expresión de EGFP y el desarrollo de los embriones, tras ser inyectados con ADN exógeno en forma previa y posterior a activación partenogenética diploide.

1.10.2.3. Objetivos específicos Capítulo IV

- Producir embriones partenogenéticos haploides, empleando diferentes protocolos de activación. Obtener embriones partenogenéticos haploides nos permitirá poseer múltiples células con núcleos idénticos al de un ovocito.
- Determinar la capacidad de desarrollo de embriones bovinos biparentales producidos por transferencia nuclear de blastómeras partenogenéticas haploides, empleando como

recipientes, cigotos producidos por FIV a los que previamente se les retiro el núcleo femenino por micromanipulación (hemicigotos masculinos).

- Producir embriones partenogénéticos haploides que expresen el gen exógeno *egfp* mediante inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas.
- Determinar la capacidad de desarrollo y de expresión transgénica de embriones bovinos biparentales producidos por fusión de blastómeras partenogénéticas haploides que expresen el gen exógeno *egfp*, con hemicigotos masculinos. Esto nos permitirá obtener embriones biparentales bovinos que expresen un gen exógeno en forma homogénea a partir de la replicación de un único ovocito.

1.10.2.4. Objetivos específicos Capítulo V

- Evaluar el desarrollo, la expresión del transgen y el nivel de fragmentación de ADN en embriones generados por FIV, tras ser inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas.
- Determinar la tasa de preñez de embriones transferidos a diferentes días de desarrollo *in vitro*, generados por FIV y tras ser inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas.

- Generar mediante inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas, bovinos transgénicos de FIV que produzcan en su leche una proteína de interés farmacológico (pro-insulina humana).

CAPITULO II

CLONACIÓN Y MULTIPLICACIÓN DEL GENOMA ESPERMÁTICO APLICADO EN LA RECONSTRUCCIÓN DE EMBRIONES

**Gabriel Vichera¹, Ramiro Olivera¹, Pablo Sipowicz², Martín Radrizzani²
y Daniel Salamone¹.**

1. Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, C1417 Buenos Aires, Argentina.
2. Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Universidad de San Martín, Av. Gral Paz 5445, B1650 Buenos Aires, Argentina.
E-mail: gvichera@agro.uba.ar.

Trabajo publicado en la revista *Reproduction, Fertility, and Development*. 2011, 23 (6): 769-779.

2.1. RESUMEN

La producción de embriones androgenéticos haploides permite obtener múltiples copias idénticas de un único genoma espermático a partir de sus sucesivas divisiones celulares. En este trabajo comparamos la capacidad de desarrollo de embriones androgenéticos haploides bovinos, construidos mediante FIV e ICSI previa y posteriormente a la enucleación. En todos los tratamientos utilizamos espermatozoides previamente incubados, o no, con el plásmido pCX-EGFP que nos permitió verificar la expresión de un transgen (*egfp*) en los embriones. Las tasas de clivaje de los embriones androgenéticos generados por ICSI previa o posterior a la enucleación fueron 80% y 53,1% respectivamente. Las tasas de clivaje de embriones androgenéticos generados por FIV previa o posterior a la enucleación fueron 55,2% y 55,7% respectivamente; ($P < 0,05$). Una vez obtenidos los embriones haploides androgenéticos, sus blastómeras fueron utilizadas como donantes de genoma masculino para reconstruir embriones biparentales mediante la fusión con ovocitos maduros. La haploidía de las blastómeras androgenéticas fue confirmada mediante análisis de cariotipo. Con el fin de generar embriones bovinos biparentales que expresen un transgen en forma homogénea, blastómeras androgenéticas que expresaron la proteína fluorescente EGFP, fueron fusionadas con ovocitos maduros. Las tasas de desarrollo de los embriones reconstruidos, alcanzaron 85,1% de clivaje, 9% de blastocistos ($n=84$) y todos los embriones expresaron el transgen durante el desarrollo *in vitro* (100%, 57/57). Para confirmar la incorporación del genoma espermático replicado en los embriones reconstruidos, se utilizaron blastómeras haploides androgenéticas de embriones generados con espermatozoides sexados “Y”. La incorporación del cromosoma “Y” fue confirmada por análisis de PCR y de FISH. Adicionalmente, se realizó un análisis de inmunohistoquímica para determinar el patrón de expresión de Oct-4 (gen marcador de pluripotencialidad celular) en los embriones reconstruidos con núcleos espermáticos replicados. En conclusión, hemos demostrado que es posible replicar genomas espermáticos haploides a partir de un único espermatozoide y que estas réplicas pueden ser utilizadas para reconstruir embriones bovinos biparentales con capacidad de desarrollo y que además esta técnica permite generar embriones bovinos biparentales que expresan un transgen en forma homogénea.

2.2. INTRODUCCIÓN

Los embriones androgenéticos y partenogénéticos son modelos eficientes para el estudio de la impronta genética (Kaneko-Ishino y col., 2003; Cruz y col., 2008; Miki y col., 2009). En particular, los embriones androgenéticos son muy útiles para estudiar la contribución del genoma paterno en el desarrollo embrionario temprano. Diferentes métodos han sido utilizados para la producción de embriones androgenéticos incluyendo: 1) remoción del pronúcleo femenino de cigotos. (Barton y col., 1984; McGrath y Solter 1984; Surani y col., 1984; Kaufman y col., 1989; Latham y Solter, 1991; Hagemann y col., 1992), 2) fertilización de ovocitos enucleados (McGrath y Solter 1984; Surani y col., 1984; Kaufman y col., 1989; Latham y Solter, 1991; Hagemann y col., 1992; Obata y col., 2000) e 3) inyección de espermatozoides dentro de ovocitos, seguida de remoción de cromosomas maternos (Miki y col., 2009). Estos métodos han sido exitosamente aplicados en el ratón y escasamente estudiados en animales de granja (Lagutina y col., 2004; Matsukawa y col., 2007; Park y col., 2009).

La generación de embriones haploides androgenéticos permite obtener múltiples blastómeras idénticas a partir de un único genoma espermático (Kuznyetsov y col., 2007). Nuestra hipótesis radica en que algunas de estas blastómeras haploides podrían ser evaluadas mediante análisis genético, y las remanentes podrían ser utilizadas para la reconstrucción de embriones biparentales con capacidad de desarrollo. Además consideramos que mediante esta técnica sería posible generar embriones bovinos biparentales que expresen un transgen en forma homogénea. Proponemos la replicación del genoma espermático para ser utilizado en producción agropecuaria debido a que permite

predecir y seleccionar mediante la utilización de marcadores moleculares, ciertos atributos zootécnicos favorables.

Brackett y col., (1971) describió la capacidad del espermatozoide de unirse a ADN exógeno y su posterior incorporación en el ovocito durante la fertilización (Brackett y col., 1971). A raíz de este hallazgo, varias técnicas de SMGT fueron desarrolladas, incluyendo: la transgénesis mediada por FIV (FIV-Tr; Lavitrano y col., 1989) y transgénesis mediada por ICSI (ICSI-Tr; Perry y col., 1999). Resultados contradictorios han sido reportados para la producción de embriones y crías transgénicas mediante FIV-Tr (Lavitrano y col., 1989; Brinster y col., 1989; Yamauchi y col., 2007). No obstante, la ICSI-Tr ha demostrado ser útil como una técnica para producir embriones transgénicos en diferentes especies de mamíferos (Perry y col., 1999; Pereyra-Bonnet y col., 2008). Sin embargo, una alta frecuencia de expresión mosaico se ha observado en embriones generados con esta técnica en la especie porcina (85,2%), bovina (60,4%), felina (78,7%) y equina (72,7%; Pereyra-Bonnet y col., 2008). En la actualidad, el desafío en la investigación sobre transgénesis consiste en encontrar una técnica eficiente para producir animales transgénicos sin expresión mosaico.

En este trabajo, comparamos la capacidad de desarrollo de embriones androgenéticos bovinos contruidos por diferentes métodos, incluyendo FIV e ICSI previa y posteriormente a la enucleación de los ovocitos. Para todos los tratamientos, utilizamos tanto espermatozoides previamente incubados, como no, con un gen reportero (pCX-EGFP) que nos permitió verificar la expresión de un transgen (*egfp*) en los embriones. Una vez obtenidos estos embriones androgenéticos haploides, sus blastómeras fueron disgregadas y

utilizadas como donantes de genoma masculino para reconstruir embriones biparentales por fusión con ovocitos maduros. Por último, verificamos nuestras hipótesis. La primera fue generar embriones que expresen un transgen en forma homogénea, mediante la fusión de blastómeras androgenéticas haploides (que expresen el transgen), con ovocitos maduros en MII. La segunda fue determinar el sexo de los núcleos espermáticos replicados antes de utilizarlos en la reconstrucción de embriones biparentales, estableciendo así una nueva y ventajosa forma de seleccionar el sexo de los embriones resultantes.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Reactivos

Todos los químicos fueron obtenidos de la compañía Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), excepto que se especifique lo contrario.

2.3.2. Colección de ovocitos y maduración *in vitro*

Ovarios fueron colectados de un matadero bovino y transportados al laboratorio. Complejos cúmulus-ovocito (COCs) fueron aspirados de folículos con un diámetro de 2 a 8 mm, en buffer fosfato (DPBS, 14287-072; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB, 10499-044; GIBCO BRL) y 2% de antibiótico-antimicótico (ATB; 15240-096; GIBCO BRL). Ovocitos cubiertos por 3 capas de células de granulosa fueron seleccionados para maduración *in vitro*. El medio de maduración fue TCM-199 (31100-035; GIBCO BRL), conteniendo 2 mM glutamina (G-8540), 10% FBS, 2 µg/ml FSH (NIH-FSH-P1, Folltropin®, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada), 0,3 mM

pyruvato de sodio (P-2256), 100 μ M cysteamina (M-9768) y 2% antibiótico. Ovocitos fueron incubados en gotas de 100 μ l de medio cubierto con aceite mineral (M8410), en placas de petri. Las condiciones de maduración *in vitro* fueron 6,5 % CO₂ en aire por 22 h. Con excepción de los ovocitos utilizados para los controles de la FIV, los ovocitos fueron desprovistos de células del cúmulus mediante agitación durante 2 min en hialuronidasa (H-4272; 1 mg/ml DPBS) y lavados tres veces en Hepar-buffered Tyrode's medium (TALP-H; Bavister y col., 1977). Ovocitos en MII fueron identificados por visualización del ICP e inmediatamente utilizados.

2.3.3. Construcción de ADN exógeno

El plásmido utilizado fue pCX-EGFP, el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente (*egfp*) controlado bajo un promotor quimera de citomegalovirus y β -actina de pollo. Este plásmido fue elegido porque permite de manera no invasiva, una rápida y eficiente detección de su expresión (Ikawa y col., 1995).

2.3.4. Incubación espermatozoides/ADN

Espermatozoides fueron lavados dos veces (490 g, 5 min) en medio Brackett-Oliphant (BO; Brackett y Oliphant, 1975) para FIV o en citrato de sodio 2,8% (F-71497) con 100 mM EDTA (15576-028, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para el procedimiento de ICSI. El pellet de espermatozoides fue resuspendido en el mismo medio y la concentración fue ajustada a 20×10^6 espermatozoides/ml. Diez μ l de suspensión de espermatozoides fueron incubados con 0,5 μ g de construcción de ADN/millón de espermatozoides (concentración final) por 5 min a 0°C e inmediatamente utilizados para el procedimiento de ICSI.

2.3.5. Fertilización *in vitro*

Semen congelado fue descongelado en un baño a 37°C durante 30 segundos. La coincubación de espermatozoides-ADN (pCX-EGFP) fue llevada a cabo como se describió anteriormente. Espermatozoides fueron centrifugados 2 veces (490 g, 5 min) y resuspendidos en medio BO suplementado con 5 mM cafeína (C-4144) y 20 IU/ml de heparina (H-3149). La concentración fue ajustada a 30×10^6 espermatozoides/ml y diluida a la mitad con BO suplementado con 10 mg/ml albúmina de suero bovina (BSA; A6003), alcanzando una concentración espermática final de 15×10^6 /ml. Ovocitos maduros y ovocitos enucleados fueron lavados 2 veces en medio BO conteniendo 5 mg/ml BSA y subsecuentemente expuestos a la suspensión espermática por 3 h en una gota de 100 μ l en una atmósfera humidificada a 39°C con 5% CO₂ en aire.

2.3.6. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Semen congelado fue descongelado en un baño a 37°C por 30 segundos. Espermatozoides fueron inmediatamente incubados o no (grupo control) con pCX-EGFP. La ICSI se realizó en placas de 100 x 20 mm (Corning, 430167) con gotas de 10 μ l de medio Tyrode's albumin lactate pyruvate buffered with HEPES (TALP-H; Bavister y Yanagimachi 1977) bajo aceite mineral (M8410) y gotas con 5 μ l de polivinilpirrolidona (PVP, 99219; Irvine Scientific, Irvine, CA, USA) al 10%, cubiertas con aceite mineral. Se agregaron ovocitos a cada una de las gotas de medio de inyección y una pequeña cantidad de espermatozoides a las gotas de PVP. Se utilizó un sistema de micromanipulación hidráulico (Medical Systems, Great Neck, NY, USA) montado a un microscopio Eclipse E-300 microscope (Nikon, Melville, NY, USA). Utilizando una pipeta de inyección se inmovilizó un

espermatozoide, se lo aspiró por la cola y se lo introdujo en el ovocito. Se tuvo en cuenta la posición del corpúsculo polar durante la inyección, éste se ubico a 90° con respecto al lugar de inyección del espermatozoide.

2.3.7. Producción de embriones androgenéticos haploides

Embriones androgenéticos haploides fueron producidos por 4 estrategias diferentes: a) FIV previa a la enucleación, b) FIV posterior a la enucleación, c) ICSI previa a la enucleación, d) ICSI posterior a la enucleación. Las técnicas de FIV e ICSI se realizaron como fueron descritas anteriormente. La enucleación se realizó de la siguiente forma: ovocitos desnudos en estadio de MII se enuclearon mecánicamente utilizando un micromanipulador hidráulico montado a un microscopio y utilizando pipetas de 20 µm de diámetro. Los cromosomas en metafase fueron visualizados bajo luz ultravioleta (< 10 sec) después de teñir con 5µg/ml H_öechst 33342 por 10 min. Los hemicigotos se cultivaron para producir embriones con blastómeras conteniendo solo réplicas de la información genética del espermatozoide (blastómeras androgenéticas haploides). Todos los tratamientos se realizaron utilizando espermatozoides previamente incubados o no (control) con pCX-EGFP.

2.3.8. Determinación de fluorescencia en embriones

Durante el cultivo *in vitro*, los embriones fueron brevemente expuestos a luz azul utilizando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 530 nm, para determinar la expresión de *egfp* a diferentes estadios de desarrollo. Embriones fueron analizados a día 3 y 7, posterior a FIV, ICSI o fusión de blastómeras androgenéticas.

2.3.9. Análisis de cariotipo

Setenta y dos horas después de la ICSI o la FIV, embriones androgenéticos se cultivaron en TCM-199 suplementado con 0,05 g/ml demecolcina (Colcemida, GIBCO BRL, USA) por 6 h. Ellos fueron expuestos a un medio hipotónico, citrato de sodio 0,8% (F-71497) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, los embriones fueron puestos en un portaobjeto y fueron tratados con una solución de metanol-acido acético (3:1). Posteriormente, los portaobjetos fueron teñidos con una solución de Giemsa 5% (10092-013, Invitrogen) por 10 minutos. Los cromosomas se evaluaron a una magnificación de 400 x.

2.3.10. Reconstrucción de embriones biparentales bovinos por fusión de blastómeras haploides androgenéticas

Embriones haploides androgenéticos (2-16 células) generados por ICSI y expresando, o no, EGFP fueron tratados con 0,05 g/ml demecolcina por 6 h para arrestarlos en metafase y sincronizar el genoma donante masculino. Posteriormente fueron lavados en TALP-H para eliminar el demecolcine y permitir la entrada de las blastómeras en G1. Seguido a la remoción de la ZP con 1,5 mg/ml de pronasa (Sigma proteasa, P-8811) disuelta en TALP-H, los embriones fueron disgregados. Blastómeras androgenéticas fueron fusionadas con ovocitos maduros en 2 diferentes formas: 1) fusión celular con ZP-incluida y 2) fusión celular ZP-libre, como se describe debajo. Blastómeras androgenéticas expresando EGFP fueron seleccionadas bajo luz azul utilizando un filtro de excitación a 488 nm y uno de emisión de 530 nm.

2.3.11. Fusión celular ZP-incluida

Blastómeras haploides androgenéticas fueron transferidas al espacio perivitelino de ovocitos en MII y eléctricamente fusionados en una cámara de fusión (BTX Instrument Division; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). El medio de fusión utilizado fue 25 μ M D-sorbitol (S-1876), 100 μ M CaOAc (C-1000), 5 mM MgOAc (M-0631), 1 g/l BSA. La fusión se llevo a cabo utilizando un pulso eléctrico de 120 V durante 30 μ s (BTX microslide 0,5 mm fusion chamber, model 450, 01-000209-01). Después de la fusión, los ovocitos fueron activados como se describe debajo.

2.3.12. Fusión celular ZP-libre

Ovocitos en MII fueron incubados en 1,5 mg/ml pronasa durante 5-10 min para remover la ZP. Ovocitos libres de ZP fueron individualmente transferidos a una gota de 1mg/ml phitohemaglutinina (L-8754) disuelta en TCM-199 sin suero, por unos pocos segundos. Seguido a esto, una blastómera haploide androgenética fue unida a cada ovocito libre de ZP y transferida a un medio de fusión (0,3 M manitol, 0,1 mM MgSO₄, 0,05 mM CaCl₂, 1mg/ml polivinil alcohol, PVA), por 2-3 minutos y luego transferidos a una cámara de fusión conteniendo 2 ml de medio de fusión. La fusión fue realizada con un doble pulso de corriente directa de 65 V, cada pulso de 30 ms con un intervalo de 0,1 segundo.

2.3.13. Activación química

Los embriones androgenéticos haploides producidos por “ICSI posterior a la enucleación”, fueron activados (inmediatamente post ICSI) con I_o (I-24222; Invitrogen) por 4 min e inmediatamente puestos en 6-DMAP (D-2629) en TCM-199 por 3 h. Los embriones androgenéticos haploides producidos por “ICSI previa a la enucleación” fueron activados

(inmediatamente post ICSI) con Io por 4 min e inmediatamente puestos en TCM-199 por 1h hasta realizarse el procedimiento de enucleación. Posteriormente a la enucleación, fueron puestos en 6-DMAP en TCM-199 por 3 h. La activación partenogenética diploide consistió en la incubación con Io por 4 min, seguido de 6-DMAP en TCM-199 por 3 h. La activación partenogenética haploide y la activación del grupo control ICSI consistió en la incubación con Io durante 4 min, luego transferidos a TCM-199 por 3h para permitir la extrusión del 2CP y finalmente puestos en 6-DMAP en TCM-199 por 3h. Los embriones reconstruidos por fusión de blastómeras androgenéticas fueron activados (2 h después de la fusión) con Io por 4 min, posteriormente puestos en fluido oviductal sintético (SOF) por 3 h para permitir la extrusión del 2CP y finalmente puestos en 6-DMAP en SOF por 3 h. En todos los casos, la concentración de Io fue 5 μ M en TALP-H y la de 6-DMAP fue 1,9 mM en TCM-199 o SOF.

2.3.14. Cultivo *in vitro*

En el primer y segundo experimento, embriones androgenéticos, partenogenéticos y de fertilización *in vitro*, fueron cocultivados con células del cúmulus en el medio de maduración original. Las condiciones de cultivo fueron 6,5% CO₂ en aire a 39°C. El clivaje fue evaluado a día 2 y la formación de mórulas y blastocistos a día 5 y 7 post fertilización o activación. En el experimento final, embriones reconstruidos o de FIV se cultivaron en medio SOF en un sistema pozo dentro de pozo (WOW, de sus siglas en ingles “Well Of the Well”; Vajta y col., 2000). Para este experimento, las condiciones de cultivo fueron 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ en aire, a 39°C. Durante el cultivo embrionario, el medio fue suplementado con 10% SFB a día 5. El clivaje fue evaluado a día 2 y la tasa de blastocistos a día 7 post fusión.

2.3.15. Hibridación Fluorescente *in-situ* (FISH)

Blastómeras de embriones androgenéticos haploides generadas utilizando espermatozoides “Y” que fueron sexados por citometría de flujo (CIALE; Capitán Sarmiento, BA, Argentina) y embriones reconstruidos con estas blastómeras fueron sometidos a análisis de FISH utilizando una sonda específica para la región p12 del cromosoma bovino Y (AY303974). La sonda fue marcada con iso-tiocianato de fluoresceína (FITC) por “Nick Translation System” (18160–010; Invitrogen). Los embriones fueron cultivados por 6 h en medio SOF suplementado con 0,05 g/ml demecolcina. Posteriormente, ellos fueron expuestos a una solución hipotónica 0,8% citrato de sodio por 10 min a 37°C. Después ellos fueron puestos en un portaobjeto y cubiertos con una solución de metanol-acido acético (3:1). Los portaobjetos conteniendo núcleos en metafase o interfase y slides conteniendo espermatozoides fueron incubados en 50 ml de 70% formamida en 2 x SSC (1 X = 150 mM NaCl y 15 mM citrato de sodio, pH 7) por 2 min y deshidratado con alcohol en porcentajes crecientes. Mientras tanto, 1 µl de sonda específica Y fue adherida a 4 µl de solución de hybridization (40% 4 X SSC, 50% formamida y 3% sulfato de dextran, 3,3 µg/ml ADN de esperma de salmón) y calentado a 95° C por 5 minutos. La sonda desnaturalizada fue puesta en el cubreobjetos, seguida por hibridación a 37°C por 30 minutos. El portaobjetos fue lavado con 0,3% Tween-20 en 0,4 X SSC a 72 °C por 2 minutos. El portaobjetos fue contrateñido con 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) y examinado en un microscopio de fluorescencia (Model IX71, Olympus, Tokyo, Japón) a 525 nm y 470 nm de longitud de onda. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (DP-72, Olympus) y analizada utilizando el software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Inc, USA). El mismo procedimiento fue utilizado en la generación de

embriones por FIV con espermatozoides sexados Y y en los embriones partenogénéticos, utilizados como controles positivos y negativos respectivamente.

2.3.16. Sexado por PCR

Blastómeras androgenéticas haploides obtenidas de embriones androgenéticos haploides producidos con espermatozoides sexados Y y embriones biparentales generados después de su fusión con un ovocito maduro, fueron chequeados por PCR utilizando cebadores de secuencias específicas de cromosomas X e Y (Colley y col., 2008). Estas blastómeras androgenéticas y los embriones reconstruidos fueron lavados en PBS, transferidos en 1 μ l en un tubo eppendorf e incubados en 10 μ l PCR buffer con proteinasa K (2 μ g/ml) a 56°C por 1 h. Proteinasa K fue inactivada a 95°C por 10 min. La mitad del producto de la reacción fue utilizado para la reacción de PCR en un volumen final de 10 μ l, conteniendo 1x PCR buffer, 1,25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1 unidad de DNA polimerasa Taq, y 0,5 mM de cada primer. Los cebadores anidados exteriores (amelF1: 50-CATGGTGCCAGCTCAGCAG-30 y amelR1: 50-CCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC-30) produjeron amplicones X de 367 pb y amplicones Y de 304 pb. Un μ l del producto de la primer PCR fue empleado como molde para la segunda PCR. Los cebadores internos (amelF2: 50-CAGCAACCAATGATGCCAGTTC-30 y amelR2: 50-GTCTTGTCTGTTGCTGGCCA-30) produjeron amplicones X de 329 pb y amplicones Y de 266 pb (Colley y col., 2008). La primera reacción de PCR consistió en un paso de calentamiento de 95°C por 10 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (55°C), un segundo paso de calentamiento a 94°C durante 30 segundos para desnaturalizar los ácidos nucleídos, un paso de alineamiento a 65°C por 30 segundos, y un paso de extensión a 72°C por 30 segundos. El ciclo 35 contiene un paso de extensión adicional a 72°C por 7 min. Las

condiciones de la segunda reacción de PCR fueron: un paso de calentamiento a 95°C por 10 min, seguido por 25 ciclos de amplificación (60°C), un segundo paso a 94°C durante 30 segundos, un paso de alineamiento a 65°C por 30 segundos y un paso de extensión a 72°C por 30 segundos. El ciclo 35 contiene un paso de extensión adicional a 72°C por 7 min. El producto de PCR (5 µl) fue analizado en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etídio.

2.3.17. Análisis inmunohistoquímico

El análisis inmunocitoquímico fue realizado sobre blastocistos bovinos, que se obtuvieron como resultado de la reconstrucción embrionaria biparental (n=3), y también sobre blastocistos bovinos de FIV control (n=4). Brevemente, los embriones fueron fijados por 30 min en 4% v/v de paraformaldehído (F-1635) en PBS y luego permeabilizados por incubación de 15 min en PBS con 0,2% de Tritón X-100 (T-9284). Las inmunorreacciones no específicas fueron bloqueadas tras incubación por 30 min con 3% v/v SFB y 0,1% v/v Tween-20 (Promega, H-5152) en PBS (Buffer de bloqueo). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario policlonal purificado anti Oct-4 (SC-8628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) diluido 1:100 en buffer de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Transcurrida esta incubación, los blastocistos fueron enjuagados en buffer de bloqueo por 15 min. Luego, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario Alexa 488-burro anti cabra IgG 2mg/ml (A11055, Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) diluido 1:1000 por 40 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de un nuevo enjuague, los embriones se incubaron con PBS conteniendo yoduro de propidio (P-4170) por 10 min en oscuridad. Los embriones fueron montados en porta objetos en 70% v/v de glicerol. El control negativo consistió en embriones incubados con el

anticuerpo secundario sin previa exposición al anticuerpo primario. Por último, los embriones fueron analizados en un microscopio confocal laser Nikon. La longitud de onda utilizada para excitar el anticuerpo secundario fue de 488 nm y de 544 nm para excitar el yoduro de propidio. Se tomaron imágenes seriadas de diferentes secciones cada 1,5 a 2 μ m a través del eje Z de cada embrión. Luego las imágenes tridimensionales fueron reconstruidas utilizando el software EZ-C1 2.20.

2.3.18. Análisis estadístico

El desarrollo embrionario *in vitro* y la expresión del transgen fue comparada por el test no paramétrico de Fisher. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, 1989). Diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0,05$.

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el primer y segundo experimento comparamos la capacidad de desarrollo y el patrón de expresión de la proteína reportera EGFP de los embriones bovinos androgenéticos haploides, producidos por FIV e ICSI en forma previa y posterior a la enucleación. Para todos los tratamientos, se utilizaron espermatozoides previamente incubados, o no, con el plásmido pCX-EGFP. Con el objetivo de verificar la ploidía de los embriones androgenéticos generados, se realizaron análisis de cariotipos. En el tercer experimento, las blastómeras de estos embriones androgenéticos haploides (2-16 células) fueron utilizadas como donantes de genoma masculino para reconstruir embriones biparentales, al ser fusionadas con ovocitos en MII. Con el fin de verificar la contribución citoplasmática de las blastómeras androgenéticas haploides en los embriones reconstruidos, blastómeras androgenéticas que expresaron la proteína fluorescente EGFP, fueron fusionadas con ovocitos maduros. Para confirmar la incorporación del genoma espermático replicado, fueron utilizadas blastómeras haploides androgenéticas de embriones generados con espermatozoides sexados Y, fueron utilizados para reconstruir embriones biparentales. La incorporación del cromosoma Y fue confirmada por análisis de PCR y de FISH. Adicionalmente, se realizó un análisis de inmunistoquímica para determinar el patrón de expresión de Oct-4 (gen marcador de pluripotencialidad celular) en los embriones reconstruidos con núcleos espermáticos replicados. En la figura 2.4.1 se observa un diagrama explicativo de la producción de embriones androgenéticos y el procedimiento de reconstrucción de embriones biparentales.

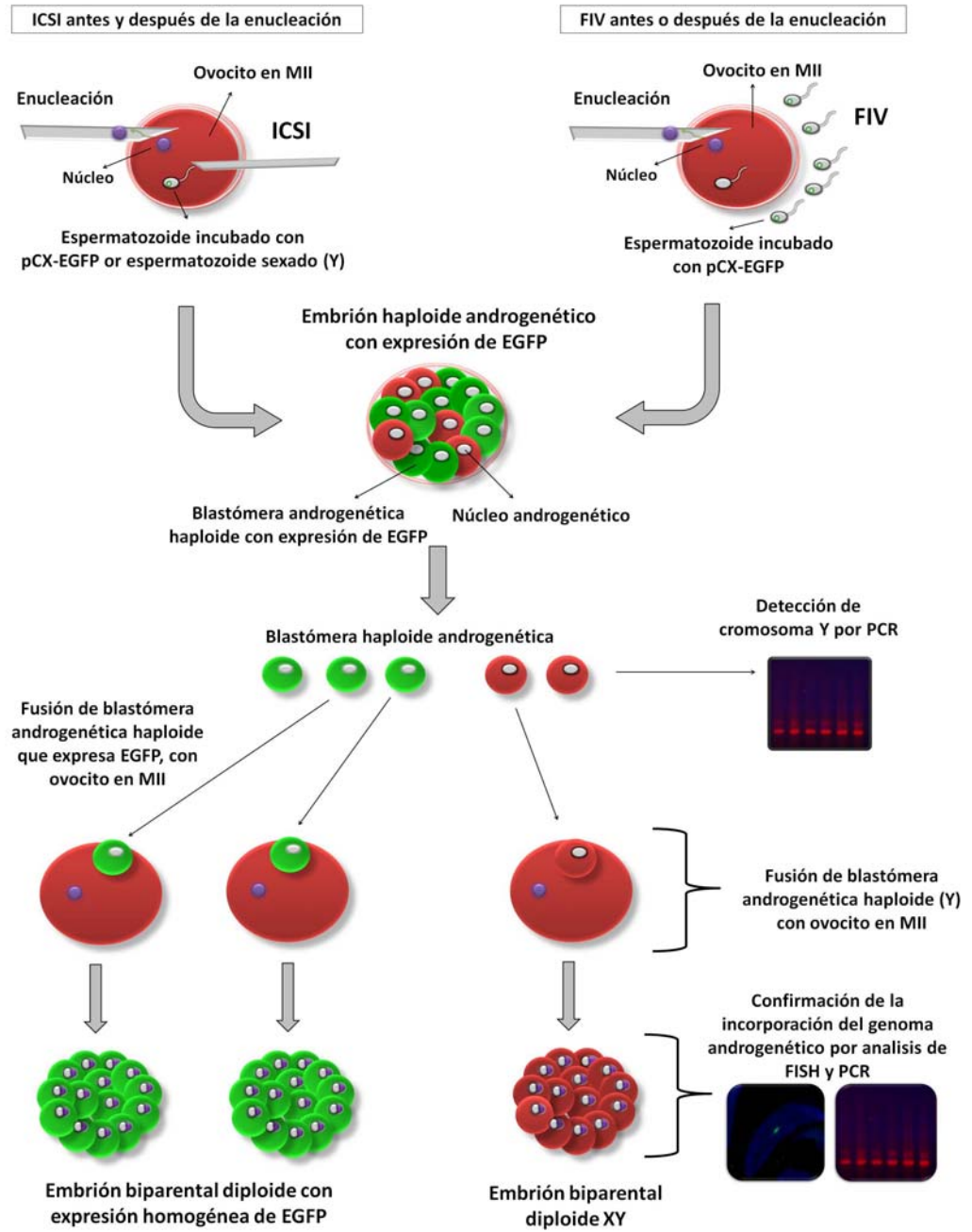


Figura 2.4.1. Diagrama explicativo de la producción de embriones androgenéticos haploides y el procedimiento de reconstrucción de embriones biparentales.

2.5. RESULTADOS

Experimento 2.5.1. Desarrollo de embriones androgenéticos, generados por FIV previa y posteriormente a la enucleación del ovocito y utilizando espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.

Los porcentajes de desarrollo y de expresión de EGFP de los embriones androgenéticos producidos por FIV se muestran en la tabla 2.5.1. Se observaron diferencias estadísticas en el clivaje entre todos los grupos de embriones androgenéticos, comparándolos con el control de FIV biparental. Sin embargo, no se observaron diferencias en el porcentaje de mórulas ni de blastocistos. Ninguno de los grupos mostró embriones con expresión de la proteína reportera EGFP. Los embriones androgenéticos generados por FIV después de la enucleación y utilizando espermatozoides previamente incubados con pCX-EGFP mostraron menor clivaje que aquellos del mismo grupo pero utilizando espermatozoides que no habían sido preincubados (32,8% vs 55,2%).

Tabla 2.5.1. Desarrollo de embriones androgenéticos haploides y expresión de EGFP, luego de FIV con espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP en bovinos.

Producción de embriones androgenéticos haploides	Repeticiones	Espermatozoides expuestos a pCX-EGFP	n	Clivados (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP 4-16 células (%)
FIV previo a la enucleación	3	+	67	22 (32,8) ^a	8 (11,9) ^{ab}	1 (1,5) ^a	0 (0)
	4	-	105	58 (55,2) ^b	23 (21,9) ^{ab}	7 (6,6) ^{ab}	NA
FIV posterior a la enucleación	3	+	61	26 (42,6) ^{ab}	7 (11,5) ^a	2 (3,3) ^{ab}	0 (0)
	4	-	106	59 (55,7) ^b	19 (17,9) ^{ab}	8 (7,5) ^{ab}	NA
FIV biparental control	4	+	280	230 (82,1) ^c	58 (20,7) ^{ab}	17 (6,1) ^a	0 (0)
	4	-	114	86 (75,4) ^c	28 (24,6) ^b	15 (13,1) ^b	NA

(a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Experimento 2.5.2. Desarrollo de embriones androgenéticos generados por ICSI previa y posteriormente a la enucleación del ovocito y utilizando espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.

Los porcentajes de desarrollo y expresión de EGFP de los embriones androgenéticos producidos por ICSI se muestran en la tabla 2.5.2. Los embriones androgenéticos obtenidos por ICSI utilizando espermatozoides expuestos a pCX-EGFP (ICSI-Tr previa y posteriormente a la enucleación) mostraron expresión de EGFP. Se observaron diferencias estadísticas en las tasas de clivaje entre los grupos “ICSI-Tr previa a la enucleación” y el control de ICSI-Tr. Adicionalmente, el análisis del desarrollo entre los grupos de embriones androgenéticos resultó en diferencias significativas respecto a las tasas de clivaje. Cuando la ICSI-Tr se realizó antes de la enucleación del ovocito, los porcentajes de clivaje fueron mayores en comparación al grupo ICSI-Tr posterior a la enucleación (61,2% vs 35,0%, respectivamente, $p < 0,05$). Tal como se esperaba, todos los grupos de embriones androgenéticos haploides tuvieron menor porcentaje de mórulas y blastocistos, independientemente de la presencia o ausencia del plásmido pCX-EGFP ni del momento de la enucleación. El patrón de expresión de EGFP fue evaluado en los embriones clivados (día 3 post-ICSI). Se observaron diferencias estadísticas en los embriones EGFP-positivos androgenéticos entre los grupos ICSI antes y después de la enucleación (25,8 % vs 11,8 %, respectivamente). El grupo de ICSI-Tr control mostró 21,9% de embriones EGFP-positivos, lo cual no fue diferente a las tasas de embriones androgenéticos EGFP-positivos. Además, se observó expresión mosaica en todos los embriones positivos de ICSI-Tr tanto en los grupos androgenéticos como en el grupo biparental control. El análisis de cariotipo realizado sobre los embriones androgenéticos generados por ICSI-Tr antes de la enucleación, confirmó que el 92% (11/12) era haploide. En el grupo de ICSI posterior a la enucleación, el 82 %

(9/11) de los embriones analizados tenía sets de cromosomas haploides. En ambos casos, los embriones restantes eran mixoploides. Por último, se observó que el desarrollo de los embriones haploides partenogenéticos y androgenéticos fue menor que el de los embriones partenogenéticos diploides ($p < 0,05$).

Experimento 2.5.3. Desarrollo y expresión del gen reportero *egfp* en embriones bovinos biparentales, reconstruidos tras la fusión de blastómeras androgenéticas haploides (EGFP-positivas o EGFP-negativas), con ovocitos maduros.

Las tasas de desarrollo y expresión de EGFP en los embriones reconstruidos con blastómeras androgenéticas haploides (expresando o no el gen reportero), se muestran en la tabla 2.5.3. No se observaron diferencias en los porcentajes de fusión ni de desarrollo entre estos dos grupos, mientras que el control de FIV biparental mostró tasas de blastocistos significativamente mayores. Cuando los embriones fueron reconstruidos con blastómeras haploides androgenéticas EGFP +, todos los embriones expresaron el gen reportero durante el desarrollo *in vitro* (100%, 57/57). El 91,2% (52/57) de estos embriones evidenció expresión en todas las células embrionarias (Tabla 2.5.3, Figura 2.5.1). Por otra parte, se testeó un método alternativo (ZP-incluida) para reconstruir embriones biparentales. Esta técnica incluye la fusión de blastómeras androgenéticas haploides previamente inyectadas en el espacio perivitelino de un ovocito en MII. Sin embargo, como resultados preliminares se vio una baja eficiencia en la fusión y bajas tasas de clivaje (53,6 % 15/28 y 40 % 6/15, respectivamente). Los análisis inmunocitoquímicos para determinar el patrón de expresión de Oct-4 mostraron señal positiva en el macizo celular interno (MCI) y en el trofoblasto en todos los blastocistos analizados (Figura 2.5.2), como así también en los blastocistos del grupo control FIV.

Tabla 2.5.2. Desarrollo de embriones androgenéticos haploides y expresión del gen reportero, luego de ICSI con espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.

Producción de embriones androgenéticos haploides	Repeticiones	Espermatozoides expuestos a pCX-EGFP	n	Clivados (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP 2-16 células (%)	Todas las células embrionarias +EGFP (%)
ICSI previa a la enucleación	4	+	116	71 (61,2) ^b	3 (2,6) ^a	0 (0) ^a	30 (25,8) ^b	3/30 (10)
	3	-	35	28 (80,0) ^c	5 (14,3) ^{bcd}	1 (2,8) ^{ab}	NA	NA
ICSI posterior a la enucleación	4	+	97	34 (35,0) ^a	1 (1,0) ^a	0 (0) ^a	4 (11,8) ^a	0/4 (0)
	3	-	32	17 (53,1) ^{ab}	0 (0) ^{ab}	0 (0) ^a	NA	NA
Control ICSI biparental	4	+	82	42 (51,2) ^b	9 (10,9) ^{bc}	8 (9,7) ^{bc}	18 (21,9) ^{ab}	1/18 (5,6)
	3	-	81	62 (76,6)	12 (14,8)	9 (11,1)	NA	NA
Control partenogenético haploide	4	-	116	76 (65,5) ^{cb}	18 (15,5) ^c	4 (3,4) ^{ab}	NA	NA
	4	-	113	84 (74,3) ^c	35 (30,9) ^d	20 (17,7) ^c	NA	NA
Control partenogenético diploide								

(a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, Positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Tabla 2.5.3. Desarrollo *in vitro* y expresión de EGFP de embriones reconstituidos por fusión de blastómeras androgenéticas haploides.

Método de producción	Repeticiones	Blastómeras androgenéticas +EGFP	n	Fusionados	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP 2-16 células (%)	Todas las células embrionarias +EGFP %
Embrión biparental reconstituido	3	+	84	67 (79,8) ^a	57 (85,1) ^a	6 (9) ^a	57 (100) ^a	52/57 (91,2)
	3	-	34	27 (79,4) ^a	24 (88,9) ^a	2 (5,9) ^a	NA	NA
FIV biparental control	3	-	124	NA	98 (79) ^a	37 (29,8) ^b	NA	NA

(a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, Positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Experimento 2.5.4. Utilización de semen sexado para confirmar la incorporación del genoma masculino replicado, en los embriones reconstruidos por fusión de blastómeras androgenéticas haploides con ovocitos maduros.

Para confirmar la incorporación del genoma masculino, 18 embriones haploides androgenéticos fueron generados utilizando semen sexado (Y), a partir de estos embriones se aislaron 60 blastómeras androgenéticas haploides y se utilizaron 24 en la reconstrucción de embriones biparentales. Todas las blastómeras se fusionaron eficientemente (100%, 24/24), 91,7% clivaron (22/24) a día 2 y el 8,3% alcanzaron el estadio de blastocisto (2/24) a día 7. La presencia del cromosoma Y en las blastómeras androgenéticas haploides remanentes y en los embriones reconstruidos con ellas, fue confirmada por PCR (Figura 2.5.3). Además, análisis de FISH realizados sobre los blastocistos generados también confirmaron la presencia del genoma espermático sexado en todas sus células (Figura 2.5.4). Los controles positivos (semen sexado y embriones de FIV generados con semen sexado) mostraron señal específica del cromosoma Y. En cambio, los embriones partenogénéticos utilizados como control negativo no mostraron ninguna señal positiva (Figura 2.5.4).

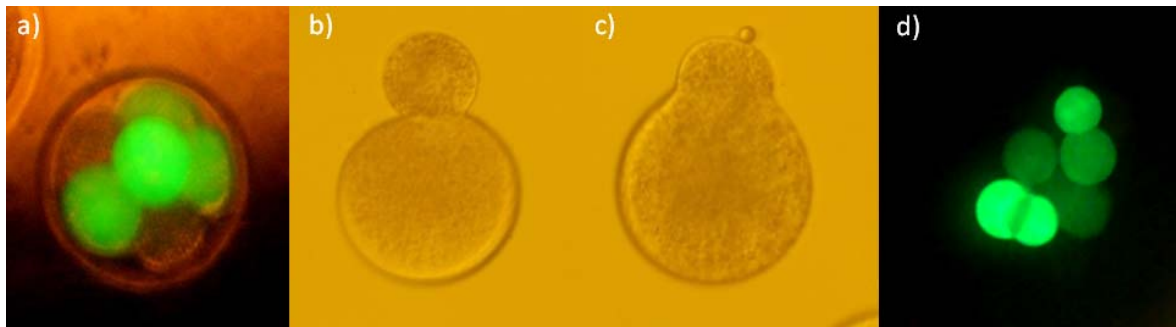


Figura 2.5.1. Reconstrucción de embriones biparentales a) Embrión androgenético haploide bovino (día 3) obtenido por ICSI utilizando espermatozoides expuestos al plásmido pCX-EGFP (ICSI-Tr previa a la enucleación) y con algunas de sus blastómeras expresando el gen reportero. b) Ovocito en MII libre de zona, unido a una blastómera androgenética haploide (utilizando fitohemaglutinina), previo a la fusión. c) ovocito en MII libre de zona fusionándose con una blastómera androgenética haploide (Magnificación original 200X). d) Embrión biparental libre de zona reconstruido, expresando el gen reportero en todas sus blastómeras. En todos los casos la fluorescencia fue evaluada bajo luz azul (488 nm; magnificación original 200X).

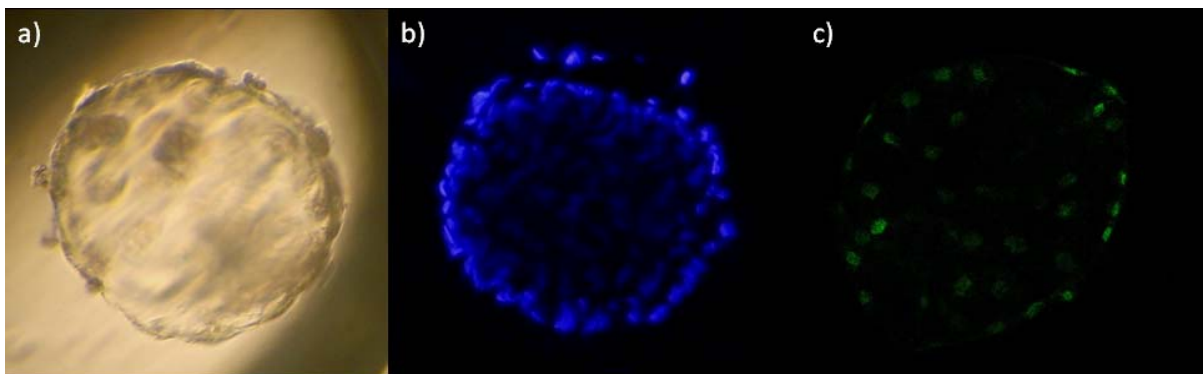


Figura 2.5.2. a) Blastocisto bovino biparental producidos por fusión de una blastómera androgenética haploide con un ovocito maduro y cultivado en el sistema WOW. b) El mismo blastocisto teñido con DAPI (azul) para visualizar los núcleos. C) Patrón de expresión de Oct-4 (FITC/verde) de blastocisto bovino biparental producido por fusión de una blastómera androgenética haploide con un ovocito maduro (Magnificación original 200X).

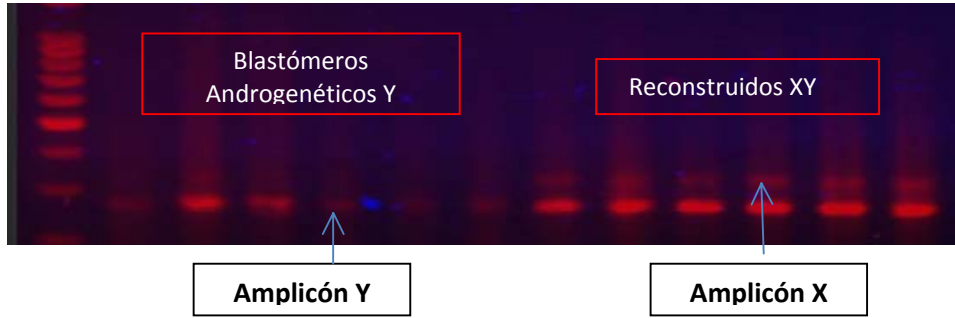


Figura 2.5.3. Amplificación de secuencias específicas del cromosoma “Y” y del cromosoma “X” por PCR de blastómeros androgenéticos (Y) y de embriones reconstruidos (XY).

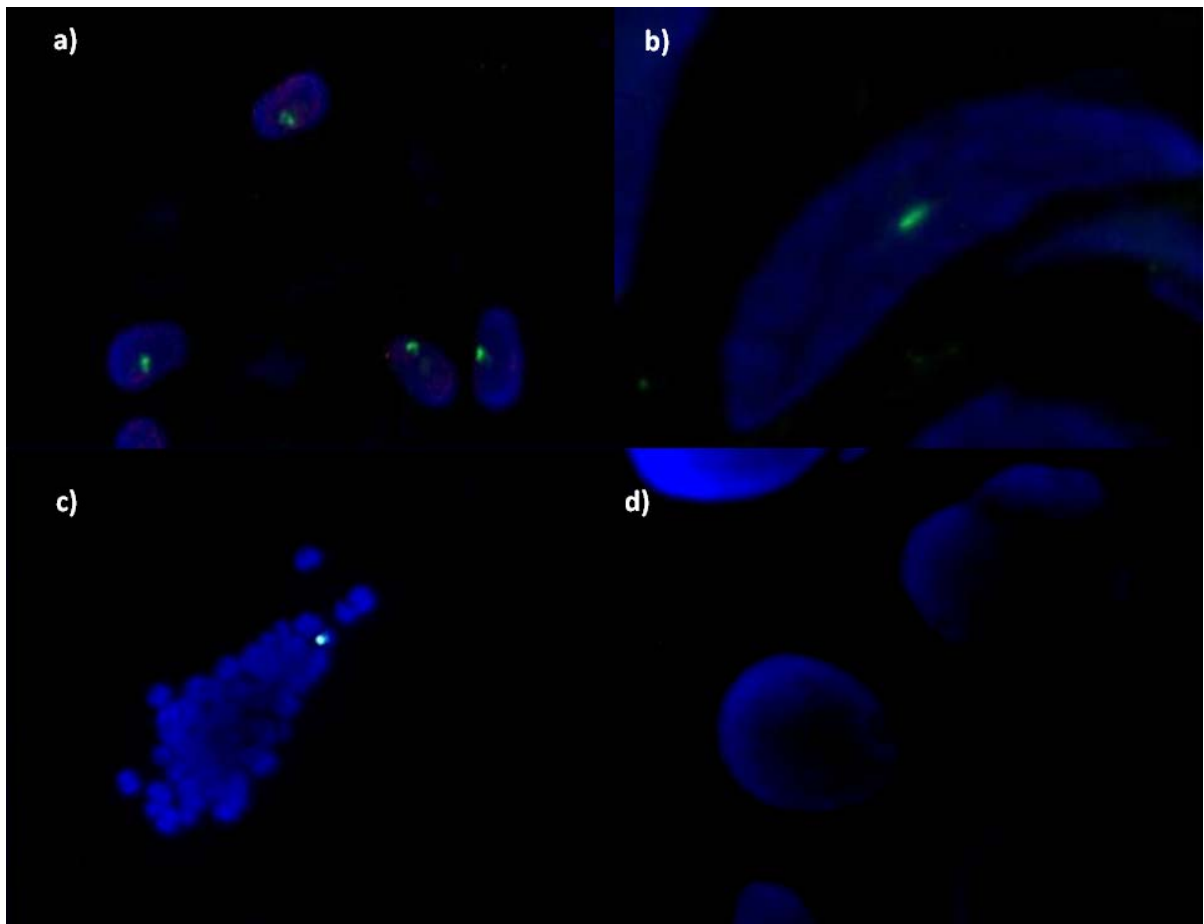


Figura 2.5.4. Fotomicrografías de hibridización fluorescente in-situ (FISH) marcando la región p12 del cromosoma Y bovino (FITC/verde) y con contratinción de DNA con DAPI (azul). a) Espermatozoide bovino sexado “Y” con marca verde positiva. b) Una célula de un blastocisto reconstruido, confirmando la presencia del genoma espermático sexado. c) Señal específica del cromosoma “Y” en un embrión FIV día 3 generado por espermatozoides sexados, utilizado como control positivo. d) Embrión partenogenético utilizado como control negativo sin señal del cromosoma Y. (Magnificación original 200X).

2.6. DISCUSIÓN

Inicialmente evaluamos dos métodos comúnmente utilizados para la generación de embriones androgenéticos por FIV, incluyendo enucleación de ovocitos fertilizados (FIV previa a la enucleación) y fertilización de ovocitos enucleados (FIV posterior a enucleación). Los embriones androgenéticos producidos por estos métodos clivaron exitosamente y no se registraron diferencias estadísticas en las tasas de mórulas y blastocistos comparadas con los controles de FIV. Esta diferencia con respecto a reportes previos ha mostrado que la mayoría de los embriones androgenéticos haploides producidos por FIV, en el bovino y en el ratón son arrestados después de las primeras divisiones celulares y sólo algunos embriones desarrollan hasta estadio de mórula compacta y blastocisto (McGrath y Solter 1984; Lagutina y col., 2004; Surani y col., 1986; Hoelker y col., 2007). Embriones androgenéticos generados por FIV, antes o después de la enucleación con espermatozoides expuestos a pCX-EGFP, clivaron y desarrollaron hasta estadio de blastocisto, pero ninguno de ellos expresó EGFP (Tabla 2.5.1). Cuando el control de FIV fue realizado utilizando espermatozoides previamente incubados con pCX-EGFP, los ovocitos fueron exitosamente fertilizados y desarrollaron como el grupo control (sin coincubación con el gen reportero), pero ningún embrión expresó EGFP. Estos resultados coinciden con reportes previos (Brinster y col., 1989; Yamauchi y col., 2007). La ausencia de embriones FIV con expresión de EGFP podría deberse a la pérdida del plásmido por parte del espermatozoide antes o durante la penetración del ovocito, como una consecuencia de las débiles interacciones entre el espermatozoide y el ADN exógeno, como fue previamente informado (Szczygiel y col., 2003).

En el segundo experimento, evaluamos el desarrollo de embriones generados por ICSI previa o posteriormente a la enucleación de los ovocitos. En nuestro trabajo, cuando la ICSI fue realizada en forma previa a la enucleación, las tasas de clivaje embrionario fueron altas en comparación con el grupo en el cual la ICSI fue realizada después de la enucleación. Estos resultados coinciden con reportes previos publicados en ratón (Miki y col., 2009). Como era de esperarse, las tasas de desarrollo de embriones androgenéticos haploides hasta estadio de mórula y blastocisto fueron bajas para todos los grupos, independientemente del momento en el cual se realizó la enucleación. El análisis del cariotipo de los embriones androgenéticos, producidos por ambos métodos (ICSI previa y posteriormente a la enucleación), confirmó que la mayoría de ellos fueron efectivamente haploides. Además, el desarrollo de embriones partenogénéticos y androgenéticos haploides fue bajo comparado con el control diploide partenogénético. Nosotros especulamos que la condición haploide de los embriones bovinos determinó un arresto en estadios tempranos del desarrollo, coincidiendo con el momento de transición de transcripción de genes materna-embriónica.

El procedimiento de ICSI permite la generación de embriones que expresan genes exógenos (Perry y col., 1999). En este experimento, nosotros demostramos la capacidad de esta técnica para generar embriones haploides androgenéticos que expresan un transgen. Tanto los embriones androgenéticos haploides obtenidos utilizando espermatozoides expuestos a pCX-EGFP como los embriones biparentales control, mostraron expresión de EGFP (Tabla 2.5.2). Este fenómeno, en contraposición con los resultados de FIV, es debido a que la ICSI evita el procedimiento de fusión de gametas, y de esta forma las débiles interacciones entre los espermatozoides y el ADN exógeno no son un impedimento para la incorporación del

gen reportero exógeno. Sin embargo, la inyección de espermatozoides previamente incubados con pCX-EGFP mostró un efecto negativo en las tasas de clivaje de embriones generados por ICSI en forma previa a la enucleación y en el control biparental de ICSI. Por otra parte, altas tasas de expresión mosaico se observaron en todos los embriones que expresaron EGFP. Una posible explicación es que la integración del transgén en el genoma ocurre después de la primera división celular (Lavitrano y col., 1989; Kaneko y col., 2005; Smith y col., 2005; Celebi y col., 2002). Otra explicación podría deberse a que el transgén no se integra y se pierde en algunas blastómeras durante las sucesivas divisiones mitóticas.

Por otro lado, en la reconstrucción de embriones biparentales, la participación de ambos genomas (paterno y materno), es esencial para lograr un desarrollo a término (McGrath y Solter 1984; Surani y col., 1984; Barra y Renard 1988). Sin embargo, cuando los genomas materno y paterno evolucionan por separado como núcleos haploides durante varios ciclos, la desincronización de uno de ellos no afecta el desarrollo a término de los embriones reconstruidos con estos núcleos (Surani y col., 1986). Además, embriones diploides de ratón, reconstruidos a partir de embriones partenogénéticos y androgenéticos haploides, en estadio de 2 células, han resultado en la producción de crías normales (Barra y Renard 1988). Esto demuestra que tanto los genomas masculino y femenino pueden activarse en forma separada y completar su desarrollo cuando se unen en un citoplasma sincronizado con estos núcleos (Barra y Renard 1988). Nuestros experimentos mostraron que genomas masculinos de embriones androgenéticos haploides hasta estadio de 16 células, pudieron generar embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto cuando

cada uno de estos genomas fueron fusionados con ovocitos en MII (Tabla 2.5.3, Figura 2.5.2).

Cuando la reconstrucción de embriones biparentales fue realizada utilizando blastómeras haploides androgenéticas que expresaban EGFP, todos los embriones expresaron el gen reportero en todas sus blastómeras (Figura 2.5.1). La eficiencia de expresión del transgen obtenida con esta nueva técnica (100%), es mayor en comparación con otros métodos descritos anteriormente. En el bovino, fue reportado que la técnica de microinyección pronuclear evidenció expresión transgénica en sólo el 11,9% de los embriones (Murakami y col., 1999), mientras que al utilizar la técnica de ICSI-Tr la eficiencia fue del 22,7% (Pereyra-Bonnet y col., 2008). Una nueva técnica recientemente desarrollada produjo embriones fertilizados, expresando un transgen, con una eficiencia del 68,4% tras la inyección de complejos ADN exógeno-liposomas (Vichea y col., 2010).

Las tasas de desarrollo no fueron afectadas cuando los embriones fueron reconstruidos con blastómeras que expresaron EGFP, sugiriendo que la expresión de EGFP no comprometió el desarrollo embrionario *in vitro*. De esta forma pudimos verificar la contribución citoplasmática de las blastómeras haploides androgenéticas en los embriones reconstruidos. Para confirmar la incorporación del genoma espermático, nosotros generamos embriones haploides androgenéticos utilizando espermatozoides sexados “Y”. Blastómeras haploides androgenéticas, aisladas de estos embriones, fueron utilizadas para la reconstrucción de embriones biparentales. La presencia del cromosoma “Y” en las blastómeras androgenéticas remanentes y en los embriones reconstruidos con ellos fue confirmado por análisis de PCR (Figura 2.5.3). La detección de secuencias específicas de ADN para

cromosomas X e Y mediante el uso de PCR ha sido empleada frecuentemente como un método de determinación del sexo de embriones (Bradbury y col., 1990; Ramalho y col., 2004). Sin embargo decidimos realizar una confirmación adicional de la presencia del cromosoma Y, utilizando análisis de FISH, el cual confirmó la presencia del genoma espermático replicado en las células de los blastocistos generados (Figura 2.5.4). La identificación del cromosoma Y, fue también posible en espermatozoides sexados y embriones control de FIV generados con ellos (Figura 2.5.4). Como era de esperarse, los embriones partenogénéticos utilizados como control negativo no mostraron señal Y positiva (Figura 2.5.4). Por otro lado, se realizó un análisis de inmunohistoquímica para determinar el patrón de expresión de un gen marcador de pluripotencialidad celular (Oct-4) en los embriones reconstruidos (Kirchhof y col., 2000). Se observó expresión positiva tanto en el MCI como en el trofoblasto de todos los blastocistos analizados, como así también en los embriones del grupo control FIV, indicando una eficiente reprogramación nuclear.

Nuestros resultados demuestran que es posible multiplicar el genoma haploide de un espermatozoide bovino y que se pueden utilizar estas replicas para generar embriones biparentales. Futuras investigaciones podrían considerar la generación de líneas estables de células haploides androgenéticas como una fuente alternativa de gametas masculinas. El establecimiento de líneas celulares estables de embriones androgenéticos haploides ya fue logrado en 1969 en la rana (Freed y Mezger-Liberado, 1970). Más recientemente, la generación de células madres haploides a partir de embriones fue descrita en el pescado Mekada; después de la transferencia nuclear a ovocitos no fertilizados, las células madres haploides generaron descendencia viable (Yi y col., 2009.). Si esto se lograra en animales de granja, tendría un enorme potencial de aplicación debido a que sería posible el análisis

de genes recesivos, lo que facilitaría en gran medida los programas de mejoramiento genético. Por otro lado, la clonación del genoma espermático podría realizarse por multiplicación de líneas androgenéticas haploides. Esto podría generar un número ilimitado de embriones biparentales mediante la combinación de estas células haploides con ovocitos maduros, creando así una nueva combinación de características genéticas de ambos progenitores en forma similar a una fertilización normal (Yanagimachi, 2005).

En conclusión, hemos demostrado que es posible replicar genomas espermáticos haploides a partir de un único espermatozoide y que estas réplicas pueden ser utilizadas para generar embriones biparentales. Esta estrategia presenta un enorme potencial de utilización en producción ganadera, debido a que permite determinar el sexo de los núcleos espermáticos replicados antes de ser utilizados en la reconstrucción de embriones. Por esta razón, representa una nueva y ventajosa forma de generar crías de sexo predeterminado, con ventajas a los sistemas tradicionales. Además, utilizando marcadores genéticos también podríamos seleccionar ciertos atributos favorables antes de la formación del embrión.

La reconstrucción de embriones biparentales por fusión de réplicas del genoma espermático, podría mejorar la producción de animales transgénicos debido a que además de aumentar el número de embriones transgénicos producidos a partir de un único espermatozoide, también genera embriones con una alta tasa de expresión homogénea del transgen. Futuras investigaciones son requeridas para determinar la eficiencia de integración y el número de inserciones del ADN exógeno obtenidos por esta técnica. La posibilidad de introducir genes para modificar el genoma con una alta eficiencia y en forma homogénea se proyecta como una herramienta para incrementar la generación de animales

transgénicos de granja, destinados a mejorar la producción ganadera, y ser utilizados en biomedicina e industria farmacéutica.

CAPITULO III

EXPRESIÓN TRANSGÉNICA EN EMBRIONES DE FERTILIZACIÓN Y PARTENOGENÉTICOS POR INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE COMPLEJOS ADN EXÓGENO- LIPOSOMAS

Gabriel Vichera, Lucia Moro y Daniel Salamone

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos
Aires, Av. San Martín 4453, C1417 Buenos Aires, Argentina.

Trabajo publicado en la revista *Reproduction in Domestic Animals*. 2010, 46 (2):214-20.

3.1. RESUMEN

La transgénesis en animales constituye una herramienta importante con muchas aplicaciones biotecnológicas. Aunque se han generado grandes avances en este campo de estudio, nosotros proponemos un método que podría aumentar en forma significativa la eficiencia de producción de animales transgénicos. Esta nueva técnica, consiste en la inyección intracitoplasmática de liposomas para introducir ADN exógeno en ovocitos y cigotos bovinos. En el primer experimento, evaluamos el desarrollo embrionario y la expresión de EGFP en embriones de FIV inyectados con diferentes concentraciones de complejos ADN exógeno-liposomas (0,5; 5; 50; 500 ng pCX-EGFP/ μ l). La mayor tasa de embriones que expresaron EGFP fue obtenida utilizando 500 ng de pCX-EGFP/ μ l. En el segundo experimento, evaluamos el desarrollo embrionario y la expresión de EGFP tras inyectar complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos, previamente a ser fertilizados y en cigotos 16 y 24 h post fertilización *in vitro*. Aproximadamente el 70% de los embriones clivados y el 50% de los blastocistos expresaron EGFP cuando complejos *egfp*-liposomas fueron inyectados 16 h post fertilización. Los porcentajes de embriones que expresaron EGFP en los grupos 24 h post fertilización y pre-fertilización fueron 30,1 y 6,3, respectivamente. Blastocistos obtenidos luego de estos procedimientos, fueron analizados por PCR, confirmando la presencia del transgén en todos los embriones. Finalmente, evaluamos el desarrollo embrionario y la expresión de EGFP en embriones partenogénéticos que resultaron de la inyección de complejos *egfp*-liposomas en ovocitos maduros previamente a ser activados y en ovocitos activados, 3 y 11 h post activación. El grupo en el cual se obtuvo la mayor tasa de expresión (48,4%), fue el inyectado 3 h post-activación. En resumen, este estudio reporta la eficiente, reproducible y rápida producción de embriones de FIV y partenogénéticos expresando un transgén, mediante la inyección intracitoplasmática de liposomas para introducir el ADN exógeno.

3.2. INTRODUCCIÓN

Los animales transgénicos constituyen una importante herramienta para la industria farmacéutica (Wilmot y col., 1990; Salamone y col., 2006), la biomedicina (Stice y col., 1998; Bondioli y col., 2001) y la producción agropecuaria (Golovan y col., 2001). Hoy en día, se utilizan diferentes métodos para la generación de animales transgénicos, incluidos la microinyección de ADN foráneo dentro del pronúcleo de un cigoto (Hammer y col., 1985; Krimpenfort y col., 1991), transferencia nuclear utilizando como donantes de núcleo células genéticamente modificadas (Schnieke y col., 1997; Cibelli y col., 1998), construcciones virales utilizadas para introducir ADN exógeno en ovocitos o a embriones (Jaenisch 1976; Chan y col., 1998) y la utilización de espermatozoides como vectores para el transgén (Lavitrano y col., 1989; Perry y col., 1999).

Hasta el momento, uno de los métodos más utilizados para la producción de animales transgénicos ha sido la microinyección de ADN dentro del pronúcleo de cigotos (Gordon y col., 1980; Hofker y Breuer 1998). Sin embargo, este método no ha tenido demasiado éxito en especies de granja debido a sus dificultades técnicas, la baja eficiencia y la elevada frecuencia de expresión mosaica del transgén. Se ha reportado que utilizando esta técnica en bovinos y porcinos la tasa de expresión del transgén fue de 3 y 20% respectivamente, resultando la mayoría de estos embriones mosaicos (Kubisch y col., 1995a, 1995b). Como resultado de estas limitaciones, todavía no se ha logrado obtener el máximo potencial en la producción de animales transgénicos. Aunque se han generado grandes avances en este campo de estudio, nosotros proponemos un método que podría aumentar en forma significativa la eficiencia de producción de animales transgénicos. Nuestra hipótesis

consiste en que la inyección intracitoplasmática de liposomas podría ser una técnica ventajosa para la introducción de ADN exógeno, en ovocitos y cigotos bovinos. Este método evitaría la centrifugación de los cigotos, necesaria para la visualización de los pronúcleos, y también evitaría la inserción de la pipeta en el pronúcleo para la descarga del transgén (Chauhan y col., 1999; Murakami y col., 1999). Por consiguiente, sería técnicamente más sencilla que la técnica de microinyección pronuclear y podría incrementar el número de cigotos que pueden ser inyectados en el mismo periodo de tiempo. Además, los liposomas tienen un bajo costo económico, son fáciles de manipular y se han utilizado con éxito en la transfección de células (Ledley 1995; Hyun y col., 2003; Jang y col., 2005) y espermatozoides (Bachiller y col., 1991). En el ratón, se han obtenido embriones que expresan EGFP luego de incubar ovocitos con liposomas portando ADN exógeno, no obstante la mayoría de estos embriones fueron mosaicos (Carballada y col., 2000, 2002).

El objetivo de este trabajo fue demostrar que la inyección intracitoplasmática de liposomas con ADN exógeno es una metodología eficiente para la producción de embriones de FIV y partenogénicos con expresión de un transgén. Examinamos la expresión de EGFP y el desarrollo de embriones generados por FIV y activación partenogénica, inyectados con complejos *egfp*-liposomas o inyectados con el plásmido que codifica para el gen *egfp* libre de liposomas. En estos ensayos, la inyección intracitoplasmática fue realizada en forma previa o posteriormente a FIV o activación partenogénica. Los embriones que se obtuvieron luego de estos procedimientos, fueron analizados por PCR para determinar la presencia del ADN exógeno. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer trabajo

en reportar la expresión de ADN exógeno en embriones bovinos de FIV o partenogénéticos mediante la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Reactivos

Idem 2.3.1.

3.3.2. Colección de ovocitos y maduración *in vitro*

Idem 2.3.2

3.3.3. Fertilización *in vitro*

Semen bovino congelado fue descongelado en agua a 37°C por 30 s. El semen fue centrifugado dos veces (490 g x 5 min) en medio BO suplementado con 5 mM de cafeína (C4144) y 20 UI/ml de heparina (H3149). El pellet obtenido se diluyó a la mitad con medio BO conteniendo 10 mg/ml de albúmina bovina libre de ácidos grasos (A6003), resultando en una concentración final de espermatozoides de 12-15 x10⁶ /ml. Con esta dilución se hicieron gotas de 100 µl y se cubrieron con aceite mineral. Luego de la maduración, los COCs se lavaron en 3 ml de TALP-H y se colocaron en grupos de 30 en la suspensión de espermatozoides. Ambas gametas fueron coincubadas durante 5 h en iguales condiciones que para la maduración. Los presuntos cigotos fueron lavados 3 veces en TALP-H y cultivados como se describe a continuación.

3.3.4. Activación química del ovocito

Ovocitos maduros (MII) fueron activados con 5 μM Io (I24222; Invitrogen, California, USA) en TALP-H por 4 min e inmediatamente incubados con 1,9 mM de 6-DMAP (D2629) en SOF por 3 h. El 6-DMAP fue removido lavando 3 veces en TALP-H.

3.3.5. Construcción de ADN

Ídem 2.3.3.

3.3.6. Coincubación de ADN y liposomas

Para los ensayos de inyección de complejos pCX-EGFP-liposomas, se coincubaron durante 15 min 1 μl de ADN (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con 3 μl de liposomas comercial (Fugene; Boehringer-Manheim, Germany). La mezcla de liposomas y ADN fue diluida a la mitad de concentración con 10% de polyvinylpyrrolidona (PVP, 99219; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) en TALP-H, alcanzando una concentración final de ADN de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para la incubación de ovocitos libres de ZP y de cigotos, la mezcla de ADN y liposomas fue diluida en medio SOF resultando en una concentración final de ADN de 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$, como fue reportado por Carballada y col., (2002).

3.3.7. Inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas

Antes y después de la FIV o activación partenogenética, el citoplasma de los cigotos y ovocitos fueron inyectados con aproximadamente 2 pl de complejos ADN exógeno-liposomas/PVP, utilizando un capilar de inyección (0,7 μM de diámetro) en un micromanipulador hidráulico Narishige (Medical Systems, Great Neck, NY, USA) montado en un microscopio Nikon Eclipse E-300 (Nikon, Melville, NY, USA).

3.3.8. Incubación de ovocitos y cigotos libres de ZP con complejos ADN exógeno-liposomas

Los ovocitos y cigotos fueron tratados con 1,5mg/ml de pronasa (P8811) en TALP-H, por 5 a 10 min, utilizando una platina térmica para remover la ZP. Los ovocitos y cigotos libres de ZP fueron incubados por 3 h con una mezcla de ADN exógeno-liposomas en medio SOF (5ng/ μ l), en atmósfera humidificada de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ en aire a 39°C, como fue reportado por Carballada y col., (2002). Las incubaciones fueron realizadas previa y posteriormente a la FIV.

3.3.9. Cultivo *in vitro*

Ovocitos fertilizados y ovocitos activados fueron cultivados en gotas de 100 μ l de medio SOF suplementado con 2,5% de SFB, en una atmósfera humidificada de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ en aire, a 39°C. Los presuntos cigotos que fueron liberados de su ZP fueron cultivados individualmente en microgotas de SOF de 5 μ l en una atmósfera humidificada de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ en aire, a 39°C. Durante el cultivo embrionario, el medio fue suplementado con 10% SFB a día 5. El clivaje fue evaluado a día 2 y la tasa de blastocistos a día 7 post FIV o activación partenogenética.

3.3.10. Determinación de fluorescencia (EGFP) en embriones

Durante el cultivo *in vitro*, los embriones fueron brevemente expuestos a luz azul utilizando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 530 nm, para determinar la expresión de EGFP a diferentes estadios de desarrollo. Embriones fueron analizados a día 3 (clivados) y 7 (blastocistos), posterior a FIV o activación partenogenética.

3.3.11. Detección del transgen por PCR

Blastocistos de día 7 fueron lavados en PBS, transferidos en un volumen de 1 μ l en un tubo eppendorf e incubados en 10 μ l de buffer PCR conteniendo proteinasa K (2 μ l/ml), a 56°C por 1 h. La proteinasa K fue inactivada a 95°C por 10 min. La mitad de la reacción fue utilizada para la reacción de PCR en un volumen final de 10 μ l, conteniendo buffer de PCR 1X, 1,25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1 unidad de Taq ADN polimerasa y 0,5 mM of cada primer. Las secuencias del primer grupo de cebadores fueron 5'-AGTTCGAGGGCGACACCCTG-3' y 5'-TCGTCCATGCCGGAGAGTGATC-3'. El primer producto obtenido de PCR fue de 369 pb. Se utilizó 1 μ l de la primera reacción de PCR como templado de la segunda reacción de PCR. Las secuencias del segundo set de cebadores fueron 5'-TGAACCGCATCGAGCTGAAG-3' y 5'-TCACGAACTCCAGCAGGACCAT-3'. Estos cebadores fueron diseñados para amplificar un fragmento de 315 pb a partir del plásmido pCX-EGFP. Las condiciones de PCR fueron: un paso de desnaturalización de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de amplificación, un segundo paso de desnaturalización de 94°C por 30 s, un paso de alineamiento (65°C por 30 s) y una extensión de 72°C por 30 s. El ciclo 35 contuvo una extensión adicional a 72°C por 7 min. El control positivo consistió en 1pg del plásmido pCX-EGFP y el control negativo fue ADN de embriones de FIV que no fueron inyectados. Los productos de PCR (5 μ l) fueron analizados en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Las muestras que evidenciaron un producto específico de PCR del transgen, fueron clasificadas como PCR positivas para el transgen.

3.3.12. Análisis estadístico

El desarrollo embrionario y la expresión del transgen fue comparada por el test no paramétrico de Fisher. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, 1989). Diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0,05$.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.4.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones bovinos de FIV utilizando diferentes concentraciones de complejos *egfp*-liposomas.

Inicialmente, para determinar las condiciones óptimas para producir embriones bovinos expresando ADN exógeno, evaluamos cuatro concentraciones de complejos *egfp*-liposomas (0,5; 5; 50; 500 ng pCX-EGFP/ μ l) que fueron inyectadas en presuntos cigotos, 16 h post-fertilización.

3.4.2. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos bovinos madurados *in vitro* y en cigotos producidos por FIV.

Diferentes ensayos se realizaron para establecer un protocolo eficiente para producir embriones transfectados utilizando complejos ADN exógeno-liposomas. Inyecciones intracitoplasmáticas fueron realizadas en forma previa a la fertilización y durante o en forma posterior a la formación pronuclear (16 y 24 h post-fertilización, respectivamente). Como control, ovocitos y cigotos se inyectaron con el plásmido libre de liposomas o simplemente coincubados con complejos ADN exógeno-liposomas. El patrón de expresión

de EGFP fue evaluado sobre embriones clivados y blastocistos (día 3 y 7 post fertilización, respectivamente). Confirmamos la viabilidad de estos embriones comparando el desarrollo de los grupos inyectados y no inyectados con respecto al grupo FIV control. Además, los blastocistos que desarrollaron a partir de ovocitos fertilizados (16 h post fertilización) fueron analizados por PCR para detectar la presencia de ADN exógeno. Este procedimiento fue realizado en embriones que expresaron o no EGFP. En cada ensayo de PCR se realizaron los siguientes controles: control positivo que consistió en el plásmido pCX-EGFP y un control negativo de ADN extraído de embriones FIV no inyectados.

3.4.3. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos activados partenogénicamente.

Evaluamos la expresión de EGFP en embriones partenogénéticos que fueron inyectados antes o después de la activación (3 y 11 h post exposición a Io). Se realizaron también controles de inyección con el plásmido libre de liposomas. El patrón de expresión de EGFP fue evaluado a día 3 post activación y el estadio de blastocisto a los 7 días de cultivo embrionario. Además, comparamos el desarrollo de los grupos inyectados con los grupos no inyectados de embriones partenogénéticos.

3.5. RESULTADOS

Experimento 3.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones de FIV utilizando diferentes concentraciones de complejos ADN exógeno-liposomas.

Evaluamos cuatro concentraciones de complejos *egfp*-liposomas (0,5; 5; 50; 500 ng pCX-EGFP / μ l) para inyectarlas en presuntos cigotos generados por FIV 16 h post fertilización. La mayor tasa de embriones con expresión de EGFP (+EGFP) se obtuvo utilizando 50 (26,6%) y 500 (38,6%) ng pCX-EGFP/ μ l. Sin embargo, se observó una mayor tendencia de blastocistos con expresión de EGFP (40%) utilizando 500 ng pCX-EGFP/ μ l (Tabla 3.5.1). Con estos resultados, decidimos utilizar la mayor concentración de complejos *egfp*-liposomas para los sucesivos experimentos.

Experimento 3.5.2. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos bovinos madurados y en cigotos producidos por FIV.

Las tasas de desarrollo y de eficiencia de transfección alcanzadas tras la inyección de complejos ADN liposomas en ovocitos y cigotos generados por FIV se muestran en la tabla 3.5.2. Detectamos embriones +EGFP en todos los grupos. Los porcentajes de embriones +EGFP fueron 68,4% y 30,1% para los grupos 16 h y 24 h post fertilización, respectivamente, y 6,3% para el grupo pre-fertilización. En nuestras condiciones los grupos control de complejos *egfp*-liposomas coincubados (n=108) y los inyectados con el plásmido libre de liposomas no mostraron expresión de EGFP (-EGFP). Todos los embriones +EGFP

del grupo pre-fertilización mostraron expresión mosaica. Sin embargo, se vio expresión homogénea en los grupos de post-fertilización; los embriones inyectados 16 h post-fertilización alcanzaron mayor porcentaje de expresión homogénea que los embriones inyectados 24 h post-fertilización (65,4% vs. 38,1%). La expresión de EGFP fue también evaluada en estadio de blastocisto a los 7 días de cultivo embrionario. Se obtuvieron blastocistos +EGFP sólo en los grupos post-fertilización (52,2% y 31,6% en los grupos 16 y 24 h post-fertilización, respectivamente; Figura.3.5.1). Además, no se obtuvieron diferencias en las tasas de desarrollo hasta blastocisto entre los grupos inyectados y el control no inyectado de FIV.

Los resultados de PCR se muestran en la tabla 3.5.3. Nosotros evaluamos 5 blastocistos +EGFP y 5 blastocistos –EGFP obtenidos tras la inyección de complejos *egfp*-liposomas. El ensayo confirmó la presencia del transgen en todos los embriones. También analizamos blastocistos –EGFP inyectados con el plásmido libre de liposomas y detectamos la presencia de *egfp* en el 40% de los embriones analizados. Este resultado podría estar indicando una posible degradación del ADN exógeno cuando el plásmido es inyectado en ausencia de liposomas. No se detectó la presencia de ADN exógeno en los blastocistos control de FIV no inyectados.

Tabla 3.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones bovinos de FIV utilizando diferentes concentraciones de complejos *egfp*-liposomas.

pCX-EGFP ng/ μ l	n	Clivados (%)	Embriones Clivados +EGFP (%)	Blastocistos (%)	Blastocistos +EGFP (%)
0,5	105	69 (65,7) ^a	0/69 (0) ^a	27 (25,7)	0/27 (0) ^a
5	82	66 (80,5) ^{bc}	0/66 (0) ^a	18 (22)	0/18 (0) ^a
50	104	79 (76,0) ^{ac}	21/79 (26,6) ^b	16 (15,4)	3/16 (18,7) ^b
500	104	70 (67,3) ^a	27/70 (38,6) ^b	20 (19,2)	8/20 (40) ^b

Tres réplicas independientes fueron realizadas para cada tratamiento. (a,b) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). +, Positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Tabla 3.5.2. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones bovinos de FIV inyectados con complejos *egfp*-liposomas.

Momento de Transfección	Inyección o coincubación de <i>egfp</i>	N	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Embriones Clivados +EGFP (%)	Expresión Homogénea (%)	Blastocistos +EGFP (%)
Pre-FIV	<i>egfp</i> -liposomas	92	63 (68,5) ^a	20 (21,7)	4/27 (6,3) ^{ab}	0/4 (0) ^a	0/20 (0) ^{bd}
	solo <i>egfp</i>	27	19 (70,4) ^{ab}	5 (18,5)	0 (0) ^{bc}	-	0/5 (0) ^{abc}
16 h post-FIV	<i>egfp</i> -liposomas	103	76 (73,8) ^{ab}	23 (22,3)	52/76 (68,4) ^{ab}	34/52 (65,4) ^b	12/23 (52,2) ^a
	solo <i>egfp</i>	35	24 (68,6) ^{ab}	8 (22,9)	0 (0) ^b	-	0/8 (0) ^{bc}
24 h post-FIV	<i>egfp</i> -liposomas	102	68 (66,7) ^a	19 (18,6)	21/68 (30,1) ^a	8/21 (38,1) ^a	6/19 (31,6) ^{acd}
	solo <i>egfp</i>	29	20 (72,7) ^{ab}	6 (31,3)	0 (0) ^{bc}	-	0/6 (0) ^b
FIV control	NA	112	93 (83) ^b	31 (27,7)	-	-	-

Tres réplicas independientes fueron realizadas para cada tratamiento. (a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). +, Positivo; EGFP, proteína verde fluorescente; FIV, fertilización.

Tabla 3.5.3. Análisis de PCR para la detección del gen exógeno *egfp* en blastocistos que desarrollaron tras ser inyectados con complejos *egfp*-liposomas.

	Inyectados con complejos <i>egfp</i> - liposomas (+EGFP Embryos) n (%)	Inyectados con complejos <i>egfp</i> -liposomas (-EGFP Embryos) n (%)	Inyectados solo con <i>egfp</i> n (%)	Control embriones no inyectados n (%)
Blastocistos analizados por PCR (n=20)	5	5	5	5
Blastocistos + <i>egfp</i>	5 (100)	5 (100)	2 (40)	0 (0)

EGFP, proteína verde fluorescente; +, Positivo; -, Negativo. Todas las inyecciones fueron hechas 16 h post-fertilización.

Experimento 3.5.3. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP de embriones bovinos tras inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en ovocitos activados partenogénicamente.

En este experimento evaluamos la expresión de EGFP en embriones partenogénicos inyectados con complejos *egfp*-liposomas antes o después de la activación del ovocito (3 h y 11 h post exposición a Io; Tabla 3.5.4; Figura 3.5.2). Embriones +EGFP fueron obtenidos en todos los grupos a los 3 días de cultivo *in vitro*. El grupo con la mayor tasa de expresión fue el inyectado 3 h post activación (48,4%). Los otros 2 grupos (pre-activados y 11 post-activación) mostraron bajas tasas de expresión de EGFP (14,3% y 13%, respectivamente). Los embriones +EGFP del grupo pre-activación mostró siempre expresión mosaica. Sin embargo, fue detectada expresión homogénea en ambos grupos de post-activación. Las tasas de expresión homogénea fueron 53,3 % y 33,3 % para los grupos 3 h y 11 h post-activación, respectivamente. La expresión de EGFP fue también evaluada en estadio de blastocisto. Los porcentajes de blastocistos +EGFP fueron 20 % y 60 % para el grupo de pre-activación y para el grupo 3h post-activación, respectivamente. Los blastocistos del grupo 11 h post-activación no mostraron expresión del transgen. Además, no se observaron diferencias en las tasas de clivaje y blastocisto entre los grupos inyectados y el control partenogénico no inyectado.

Tabla 3.5.4. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP en embriones partenogenéticos bovinos inyectados con complejos *egfp*-liposomas.

Momento de Transfección	Inyección o coincubación de <i>egfp</i>	n	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Embriones Clivados +EGFP (%)	Expresión Homogénea (%)	Blastocistos +EGFP (%)
Pre-Activación	<i>egfp</i> -liposomas	18	14 (77,8)	5 (27,8)	2/14 (14,3) ^a	0/2 (0)	1/5 (20) ^{ab}
	solo <i>egfp</i>	22	16 (72,7)	5 (22,7)	-	-	-
16 h post-Activación	<i>egfp</i> -liposomas	42	31 (73,8)	10 (23,8)	15/31 (48,4) ^b	8/15 (53,3)	6/10 (60) ^a
	solo <i>egfp</i>	24	17 (70,8)	5 (20,8)	-	-	-
24 h post-Activación	<i>egfp</i> -liposomas	28	23 (82,1)	5 (17,9)	3/23 (13,0) ^a	1/3 (33,3)	0/5 (0) ^b
	solo <i>egfp</i>	30	26 (86,7)	4 (13,3)	-	-	-
Control Partenogenético	NA	40	31 (77,5)	13 (32,5)	-	-	-

Dos réplicas independientes fueron realizadas para cada tratamiento. (a,b) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). +, Positivo; -, Negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

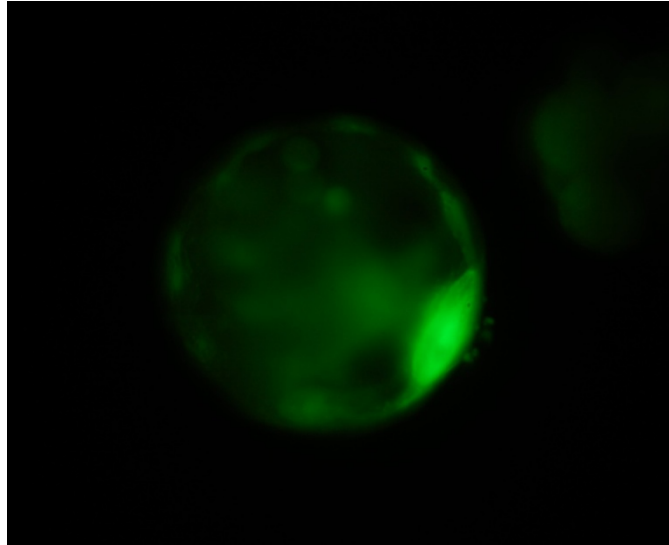


Figura 3.5.1. Blastocisto +EGFP generado por FIV e inyección intracitoplasmática de complejos pCX-EGFP-liposomas. La fluorescencia fue evaluada bajo luz azul (488 nm; magnificación original X200).

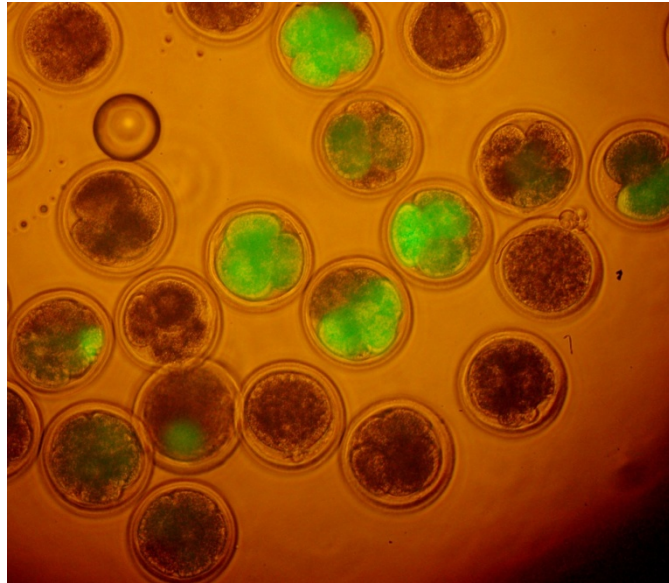


Figura. 3.5.2. Embriones partenogénéticos +EGFP inyectados con complejos *egfp*-liposomas e iluminados bajo una combinación de luz azul y luz blanca (488 nm; magnificación original X200).

3.6. DISCUSIÓN

En este trabajo examinamos el desarrollo y la expresión de EGFP en embriones bovinos obtenidos por FIV y por activación partenogénica, tras ser inyectados con complejos *egfp*-liposomas. Nuestros resultados indican que los cigotos pueden ser transfectados de manera exitosa y sencilla utilizando este nuevo método. Aproximadamente, el 70% de los embriones clivados y el 50% de los blastocistos obtenidos expresaron EGFP cuando los complejos *egfp*-liposomas fueron inyectados 16 h post fertilización y la concentración de ADN utilizada fue la más alta de las concentraciones testeadas (Tabla 3.5.1 y 3.5.2). Este resultado contrasta con reportes previos los cuales muestran que la expresión del transgen en el bovino se da en 11,9% de los embriones y en 2,9% de los blastocistos, tras la microinyección pronuclear del mismo plásmido que fue utilizado en este estudio (Murakami y col., 1999). También se observaron bajos porcentajes de blastocistos con expresión transgénica (3,2%) cuando se utilizó una construcción diferente (SV40-LacZ, Kubisch y col., 1995a,b). Además de la alta expresión obtenida, nosotros demostramos que los cigotos inyectados desarrollaron en tasas similares a los controles de FIV (Tabla 3.5.2). Al igual que otros trabajos reportados, la transfección con liposomas no reduce significativamente la viabilidad de los embriones y un alto número de embriones puede ser generado (Carballada y col., 2000).

Cuando la inyección de *egfp*-liposomas fue realizada en forma previa a la FIV, obtuvimos bajos porcentajes de +EGFP (6,3%) y ninguno de los blastocistos mostró expresión transgénica. Estos resultados no son consistentes con la alta eficiencia de transfección obtenida por otros autores (56% +EGFP), tras la utilización de lentivirus para transfectar

ovocitos en MII (Chan y col., 1998). Además, en algunos casos no todas las células fueron transfectadas y se generaron embriones mosaicos. Esto indica que la importación al núcleo o la integración ocurrirían después de la primera división embrionaria. Murakami y col., (1999) reportó que la mayoría de los embriones bovinos fueron mosaicos (70,3%) cuando microinyectó con una construcción EGFP-cDNA bajo el control de un promotor beta-actina de pollo y citomegalovirus. Los resultados de nuestro mejor tratamiento, inyectando complejos *egfp*-liposomas 16 h post-fertilización mostró poca expresión mosaica en embriones clivados evaluados a día 3 de cultivo *in vitro* (34,6%, Tabla 3.5.2).

Las altas tasas de expresión de EGFP que se obtuvieron cuando los complejos ADN exógeno-liposomas fueron inyectados durante la formación pronuclear (16 h post-fertilización; Liu y Yang 1999) y las bajas tasas que se obtuvieron cuando la inyección se realizó después de la formación pronuclear (24 h post-fertilización) puede deberse a la dinámica nuclear que ocurre tras la fertilización. Cuando un espermatozoide penetra un ovocito la cromatina descondensa y se forman los pronúcleos (Xu y Greve 1988; Liu y Yang 1999). Durante este período las protaminas se disocian del ADN espermático y las histonas se asocian a él, permitiendo que ocurra la replicación (Bedford., 1983). La integración del ADN foráneo puede suceder durante este proceso ya que el ADN se descondensa y es más susceptible a rupturas (Kubisch y col., 1995 a,b). Cuando los complejos ADN exógeno-liposomas son inyectados en el ovoplasma, el ADN exógeno debe entrar al núcleo para poder ser transcrito. Nosotros sugerimos que los liposomas son capaces de transportar el ADN exógeno al núcleo del ovocito bovino, basándonos en que obtuvimos una gran cantidad de embriones +EGFP (Tabla 3.5.1 y 3.5.4).

Los embriones partenogénicos mostraron tasas de expresión de EGFP similar a los embriones de FIV luego de la inyección de complejos *egfp*-liposomas. Los porcentajes de expresión del transgen cuando la inyección fue realizada durante la formación pronuclear (3 h post activación; Szöllösi y col., 1993; Liu y Yang 1999) fueron aproximadamente 50% y 60% en embriones y blastocistos, respectivamente. Estos resultados demostraron que la transfección con ADN exógeno y su expresión en los embriones resultantes son independientes de la presencia del pronúcleo masculino.

Los resultados de detección del transgen obtenidos mediante ensayo de PCR (Tabla 3.5.3) confirmaron la presencia del plásmido pCX-EGFP tanto en blastocistos +EGFP como en blastocistos -EGFP, tras haber sido microinyectados con *egfp*-liposomas. Sin embargo en embriones microinyectados con el plásmido libre de liposomas, el ADN exógeno fue detectado sólo en el 40% de los blastocistos analizados. Estos resultados podrían indicar que en estos embriones el ADN exógeno fue degradado en el citoplasma, sugiriendo que los liposomas retienen y protegen al ADN exógeno de las endonucleasas hasta su transcripción.

El hallazgo más importante de este estudio consistió en la eficiente obtención de embriones de FIV con expresión transgénica luego de la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas. Además, es posible que ciertos problemas asociados con la clonación y la ICSI-SMGT pudieran ser sorteados utilizando esta técnica. En particular, la eliminación de la asistencia química requerida para la activación embrionaria que se utiliza en ambos procedimientos y generan defectos en la cromatina (De La Fuente y King 1998; Yoo y col., 2003; Bhak y col., 2006).

En resumen, la inyección intracitoplasmática de liposomas para introducir ADN exógeno en cigotos puede ser un método útil, reproducible y más rápido que la microinyección pronuclear, para generar embriones bovinos transgénicos en gran escala. Futuras investigaciones son requeridas para determinar la eficiencia de integración y el número de inserciones del ADN exógeno obtenidos por esta técnica.

CAPITULO IV

CLONACIÓN Y MULTIPLICACIÓN DEL GENOMA DE UN OVOCITO APLICADO EN LA RECONSTRUCCIÓN DE EMBRIONES

Gabriel Vichera, Ramiro Olivera y Daniel Salamone

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av.

San Martín 4453, C1417 Buenos Aires, Argentina.

E-mail: gvichera@agro.uba.ar.

Trabajo publicado en la revista *Zygote*, 2012, 5:1-9.

4.1. RESUMEN

La clonación del genoma del ovocito es posible a partir de la generación de embriones partenogenéticos haploides, donde cada blastómeras partenogenética se considera un clon de la gameta original. Nuestro objetivo fue generar réplicas del genoma de un ovocito y utilizar estas réplicas para reconstruir embriones biparentales mediante su fusión con ovocitos fertilizados a los cuales previamente se les retiro su núcleo (hemicigotos masculinos). Estos embriones biparentales también fueron reconstruidos a partir de blastómeras haploides partenogenéticas que expresaban un transgen (EGFP), generando embriones biparentales con expresión transgénica homogénea. En el primer experimento, embriones haploides partenogenéticos fueron generados incubando ovocitos en Io y 6-DMAP con un intervalo de 3 h, permitiendo la extrusión del segundo corpúsculo polar. La tasa de clivaje de los embriones partenogenéticos haploides fue de 87,3%. Para generar blastómeras que expresan un transgen, ovocitos activados fueron inyectados con complejos pCX-EGFP-liposomas, 3h post exposición a Io, resultando en una tasa de clivaje del 84,4%. En el segundo experimento, blastómeras haploides partenogenéticas que expresaron o no EGFP, fueron utilizadas para reconstruir embriones biparentales. Las tasas de clivaje y de blastocistos de los embriones reconstruidos utilizando blastómeras que expresaron EGFP fueron de 78,4% y 10,8%, respectivamente y utilizando blastómeras sin expresión de EGFP fueron 61,1% y 8,4%, respectivamente; ($p < 0,05$). Todos los embriones reconstruidos utilizando blastómeras partenogenéticas que expresaban el transgen mostraron expresión de EGFP (100%) y el 96,6% de ellos en forma homogénea. Además, se evaluó la expresión de Oct-4 en los blastocistos reconstruidos. El patrón que se obtuvo fue similar al de los blastocistos control de fertilización *in vitro*. En conclusión, nuestros resultados demostraron que es posible utilizar réplicas del genoma de ovocitos para reconstruir embriones bovinos biparentales y que esta técnica es eficiente para generar embriones que expresaron un transgen en forma homogénea.

4.2. INTRODUCCIÓN

La clonación del genoma del ovocito es posible a partir de la generación de embriones partenogénicos haploides, donde cada blastómeras partenogénica se considera un clon de la gameta original (Surani y col., 1986; Escribá y col., 2001). La activación partenogénica puede ser estimulada en varias especies de mamíferos, incluyendo humanos (Revazova y col., 2007; de Fried y col., 2008), por una gran variedad de estímulos químicos y físicos. Estos estímulos incluyen impulsos eléctricos, tratamientos con etanol, timerosal, estroncio, Io o ionoforo de Ca (Collas y col., 1993; Loi y col., 1998; Yi y col., 2005; Machaty y col., 1997; Méo y col., 2007; Liu y col., 2002; Rho y col., 1998; Bhak y col., 2006). En el bovino, Io en combinación con 6-DMAP ha demostrado ser un tratamiento particularmente efectivo para inducir activación de ovocitos y su subsecuente desarrollo partenogénico (Susko-Parrish y col., 1994; Wells y col., 1999). El tratamiento Io en combinación con 6-DMAP (Io+DMAP) fue utilizado para activar citoplastos en procedimientos de clonación en bovinos, demostrando su eficiencia para promover el desarrollo a término (Cibelli y col., 1998; Salamone y col., 2006). Ovocitos activados con Io+DMAP expuestos a un intervalo de 3 h entre la activación con Io y el 6-DMAP (Io+3h+DMAP), extruyen su 2CP durante este intervalo y generan en consecuencia embriones partenogénicos haploides (Susko-Parrish y col., 1994; Vichera y col., 2009). Si el intervalo de 3 h entre Io y 6-DMAP está ausente, la mayoría de los ovocitos activados no extruye el 2CP, resultando en la formación de embriones partenogénicos diploides (Susko-Parrish y col., 1994; Wells y col., 1999; Cibelli y col., 1998; Salamone y col., 2006; Vichera y col., 2009).

Informes previos de activación partenogénica indicaron que no se observan diferencias significativas en la capacidad de división entre embriones partenogénicos haploides y diploides; sin embargo, solo una baja proporción de embriones partenogénicos haploides desarrollan hasta estadio de blastocisto (Surani y col., 1986; Escribá y col., 1999; Escribá y col., 2000; Lagutina y col., 2004). Además, los embriones partenogénicos son incapaces de desarrollar a término debido al mecanismo de impronta, que regula el desarrollo durante la embriogénesis (Surani y col., 1986; MacGrath y col., 1983; McGrath y col., 1984; Surani y col., 1984). Por lo tanto, para obtener descendencia viable a partir de embriones partenogénicos haploides, cada blastómera de estos embriones debe ser combinada con su contraparte masculina (hemicigotos masculinos) a fin de restablecer la condición heteroparental normal. Hemicigotos masculinos pueden generarse por remoción del pronúcleo femenino de ovocitos fertilizados (Barton y col., 1984; McGrath y Solter 1984; Surani y col., 1984; Kaufman y col., 1989; Latham y Solter 1991; Hagemann y col., 1992), por fertilización de ovocitos enucleados (McGrath y Solter 1984; Surani y col., 1984; Kaufman y col., 1989; Latham y Solter 1991; Hagemann y col., 1992; Obata y col., 2000) y por inyección de espermatozoides en ovocitos maduros, seguido de remoción de los cromosomas maternos (Miki y col., 2009).

En éste trabajo se comparó la capacidad de desarrollo de embriones bovinos partenogénicos haploides y diploides. Una vez obtenidos, blastómeros de embriones partenogénicos haploides fueron utilizados como donantes de genoma femenino para reconstruir embriones biparentales por fusión con hemicigotos masculinos. Por último generamos embriones biparentales bovinos que expresaron un transgen en forma

homogénea tras fusionar blastómeras que expresaron el transgen con hemicigotos masculinos.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Reactivos

Idem 2.3.1.

4.3.2. Colección de ovocitos y maduración *in vitro*

Idem 2.3.2.

4.3.3. Producción de embriones partenogenéticos haploides y diploides

Los ovocitos en MII fueron identificados por visualización del 1CP e inmediatamente utilizados para activación partenogenética o técnicas de micromanipulación. La activación partenogenética haploide consistió en: 1) incubación con 5 μ M Io (I24222; Invitrogen, Carlsbad, California, USA) por 4 minutos. 2) incubación con 5 μ M Io por 4 min, puestos en SOF por 3 h para permitir la extrusión del 2CP, y finalmente puestos en 1,9 mM 6-DMAP (D2629) en SOF por 3h. La activación partenogenética diploide consistió en incubación con 5 μ M Io por 4 minutos seguido por 1,9 mM 6-DMAP en SOF por 3 h.

4.3.4. Construcción de ADN exógeno

Idem 2.3.3.

4.3.5. Coincubación de DNA y liposomas

Para los experimentos de inyección, se coincubo durante 15 min 1 μ l de ADN (4 μ g/ml) con 3 μ l de liposomas comercial (Fugene; Boehringer-Manheim, Germany). La mezcla de liposomas y ADN fue diluida a la mitad con 10% de polyvinylpyrrolidona (PVP, 99219; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), alcanzando una concentración final de ADN de 0,5 μ g/ml.

4.3.6. Inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas

Después de 3 h de la activación partenogénica utilizando Io, el citoplasma de los ovocitos activados fue inyectado con aproximadamente 2 pl de complejos ADN exógeno-liposomas/PVP. Se utilizó un capilar de inyección (0,7 μ m de diámetro) unido a un micromanipulador hidráulico Narishige (Medical Systems, Great Neck, NY, USA) montado en un microscopio Nikon Eclipse E-300 (Nikon, Melville, NY, USA).

4.3.7. Producción de hemicigotos masculinos

Hemicigotos masculinos fueron generados por fertilización de ovocitos enucleados. La enucleación se realizó de la siguiente forma: ovocitos desnudos en estadio de MII fueron mecánicamente enucleados utilizando un micromanipulador hidráulico montado a un microscopio y utilizando pipetas de 20 μ m de diámetro. Los cromosomas en metafase fueron visualizados bajo luz ultra violeta (UV, < 10 sec) después de teñir con 5 μ g/ml H \ddot{o} chst 33342 por 10 min. La fertilización de ovocitos enucleados se realizó de la siguiente forma: Semen congelado fue descongelado en un baño a 37°C durante 30 segundos. Los espermatozoides fueron centrifugados 2 veces (490 x g, 5 min) y resuspendidos en medio Brackett–Oliphant (BO) suplementado con 5 mM cafeína (C-4144)

y 20 IU/ml de heparina (H-3149). La concentración fue ajustada a 30×10^6 espermatozoides/ml y diluida a la mitad con BO suplementado con 10 mg/ml albúmina de suero bovina (BSA; A6003), alcanzando una concentración espermática final de 15×10^6 /ml. Ovocitos maduros y ovocitos enucleados fueron lavados 2 veces en medio BO conteniendo 5 mg/ml BSA y subsecuentemente expuestos a la suspensión espermática por 3 h en una gota de 100 μ l en una atmósfera humidificada a 39°C con 5% CO₂ en aire. Posteriormente a esta incubación los hem cigotos fueron inmediatamente utilizados para la reconstrucción de embriones biparentales.

4.3.8. Análisis de cariotipo

Setenta y dos horas después de la FIV, embriones fueron cultivados en SOF suplementado con 0,05 g/ml demecolcine (D1925) por 6 h. Ellos fueron expuestos a un medio hipotónico, citrato de sodio 0,8% (F-71497) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, los embriones fueron puestos en un portaobjeto y se trataron con una solución de metanol-acido acético (3:1). Finalmente, los portaobjetos fueron teñidos con una solución de Giemsa 5% (10092-013, Invitrogen) por 10 minutos. Los cromosomas fueron evaluados a una magnificación de 400 x.

4.3.9. Reconstrucción de embriones biparentales bovinos por fusión de blastómeras haploides partenogenéticas

Embriones haploides partenogenéticos (2-16 células) expresando, o no EGFP, fueron tratados con 1,5 mg/ml de pronasa (Sigma proteasa, P-8811) disuelta en TALP-H para remover la ZP. Seguido a la remoción de la ZP, las blastómeras de estos embriones fueron disgregadas mediante pipeteo. Blastómeras androgenéticas expresando EGFP fueron

seleccionadas bajo luz azul utilizando un filtro de excitación a 488 nm y uno de emisión de 530 nm. Blastómeras partenogénicas fueron fusionadas con hemicigotas masculinos, como se describe debajo. Hemicigotas masculinos fueron incubados en 1,5 mg/ml pronasa durante 5-10 min para remover la ZP. Hemicigotas masculinos libres de ZP fueron individualmente transferidos a una gota de 1mg/ml fitohemaglutinina (L-8754) disuelta en TCM-199 sin suero, por unos pocos segundos. Seguido a esto, una blastómera partenogénica haploide fue unida a cada hemicigotas masculino libre de ZP y transferidos a medio de fusión (0,3 M manitol, 0,1 mM MgSO₄, 0,05 mM CaCl₂, 1mg/ml PVA), por 2-3 minutos y luego transferidos a una cámara de fusión conteniendo 2 ml de medio de fusión. La fusión fue realizada con un doble pulso de corriente directa de 65 V, cada pulso de 30 ms con un intervalo de 0,1 segundo. Posteriormente a la fusión, los cigotos biparentales reconstruidos fueron cuidadosamente puestos en cultivo.

4.3.10. Cultivo

Embriones partenogénicos, reconstruidos y de fertilización *in vitro*, fueron cultivados en medio SOF en un sistema similar al WOW (Vajta y col., 2000), en el cual los microporos fueron realizados utilizando un capilar caliente presionado contra la base de la placa de cultivo y cubiertos con una microgota de 100 µl de SOF (16 WOWs por cada microgota, 1 embrión por cada WOW). Las condiciones de cultivo fueron 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ en aire, a 39°C. Durante el cultivo embrionario, el medio fue suplementado con 10% SFB a día 5. El clivaje fue evaluado a día 2 y la tasa de blastocistos a día 7 post fusión.

4.3.11. Determinación de fluorescencia (EGFP) en embriones

Durante el cultivo *in vitro*, los embriones fueron brevemente expuestos a luz azul utilizando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 530 nm, para determinar la expresión de EGFP a diferentes estadios de desarrollo. Embriones fueron analizados a día 3 y 7, posterior a activación partenogenética o reconstrucción embrionaria.

4.3.12. Determinación del número de células de los blastocistos

Blastocistos fueron teñidos en TCM-199 conteniendo 1mg/ml Hoechst 33342 (B2261), por 2 minutos y montados inmediatamente entre porta y cubreobjetos. Para determinar el número de células los blastocisto teñidos fueron iluminados con luz UV en un microscopio de epifluorescencia.

4.3.13. Análisis inmunohistoquímico

El análisis inmunocitoquímico fue realizado sobre blastocistos bovinos, obtenidos como resultado de la reconstrucción embrionaria biparental, y también sobre blastocistos bovinos de FIV control. Brevemente, los embriones fueron fijados por 30 min en 4% v/v de paraformaldehído (F-1635) en buffer fosfato (PBS) y luego permeabilizados por incubación de 15 min en PBS con 0,2% de Tritón X-100 (T-9284). Las inmunorreacciones no específicas fueron bloqueadas tras incubación por 30 min con 3% v/v SFB y 0,1% v/v Tween-20 (Promega, H-5152) en PBS (Buffer de bloqueo). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario policlonal purificado anti Oct-4 (SC-8628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) diluido 1:100 en buffer de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Transcurrida esta incubación, los blastocistos fueron enjuagados en buffer de bloqueo por 15 min. Luego, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo

secundario Alexa 488-burro anti-cabra IgG 2mg/ml (A11055, Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) diluido 1:1000 por 40 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de un nuevo enjuague, los embriones se incubaron con PBS conteniendo yoduro de propidio (P-4170) por 10 min en oscuridad. Los embriones fueron montados en porta objetos en 70% v/v de glicerol. El control negativo consistió en embriones incubados con el anticuerpo secundario sin previa exposición al anticuerpo primario. Por último, los embriones fueron analizados en un microscopio confocal laser Nikon. La longitud de onda utilizada para excitar el anticuerpo secundario fue de 488 nm y de 544 nm para excitar el yoduro de propidio. Se tomaron imágenes seriadas de diferentes secciones cada 1,5 a 2 μ m a través del eje Z de cada embrión. Luego las imágenes tridimensionales fueron reconstruidas utilizando el software EZ-C1 2.20.

4.3.14. Transferencia embrionaria

Embriones reconstruidos fueron transferidos a vacas recipientes Angus al día 7 de su ciclo estral en estadio de blastocisto (día 7 de cultivo *in vitro*). Cada embrión reconstruido fue lavado varias veces en TL-HEPES y cargados en pajuelas de 0,25 ml. Dentro de las 3 h, los embriones fueron transportados al centro de transferencia a 35°C. Los embriones fueron transferidos en forma no quirúrgica al cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo utilizando un dispositivo de transferencia de tipo transversal. Cada vaca recipiente recibió un embrión. Las preñeces fueron diagnosticadas por palpación de la membrana fetal mediante inspección rectal aproximadamente a los 60-70 días después del estro.

4.3.15. Análisis estadístico

El desarrollo embrionario *in vitro* y la expresión del transgen fue comparada por el test no paramétrico de Fisher. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, 1989). Diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0,05$.

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el primer experimento, comparamos la capacidad de desarrollo de embriones partenogénéticos haploides y diploides producidos con I_0 , $I_0+3h+DAMP$ y I_0+DMAP . Ovocitos activados con el mejor tratamiento haploide ($I_0+3h+DAMP$) fueron inyectados con complejos pCX-EGFP-liposomas, con el fin de obtener expresión de un gen reportero exógeno y utilizarlo como marcador citoplasmático. Análisis de cariotipo fue realizado para determinar la ploidía de los embriones partenogénéticos y de los hemicingotos masculinos generados. En el segundo experimento, embriones partenogénéticos haploides (4-16 células) expresando, o no EGFP, fueron desagregados y las blastómeras partenogénéticas haploides fueron fusionadas con hemicingotos masculinos con el fin de reconstruir embriones biparentales diploides. Se evaluó la capacidad de desarrollo de los embriones reconstruidos y su número de células. Además se evaluó por inmunocitoquímica el patrón de expresión de Oct-4 en los blastocistos obtenidos por reconstrucción biparental de embriones. Finalmente, embriones biparentales reconstruidos fueron transferidos a vacas receptoras a los 7 días de desarrollo *in vitro*. En la figura 4.4.1 se observa un diagrama explicativo de la producción de embriones partenogénéticos haploides y el procedimiento de reconstrucción de embriones biparentales.

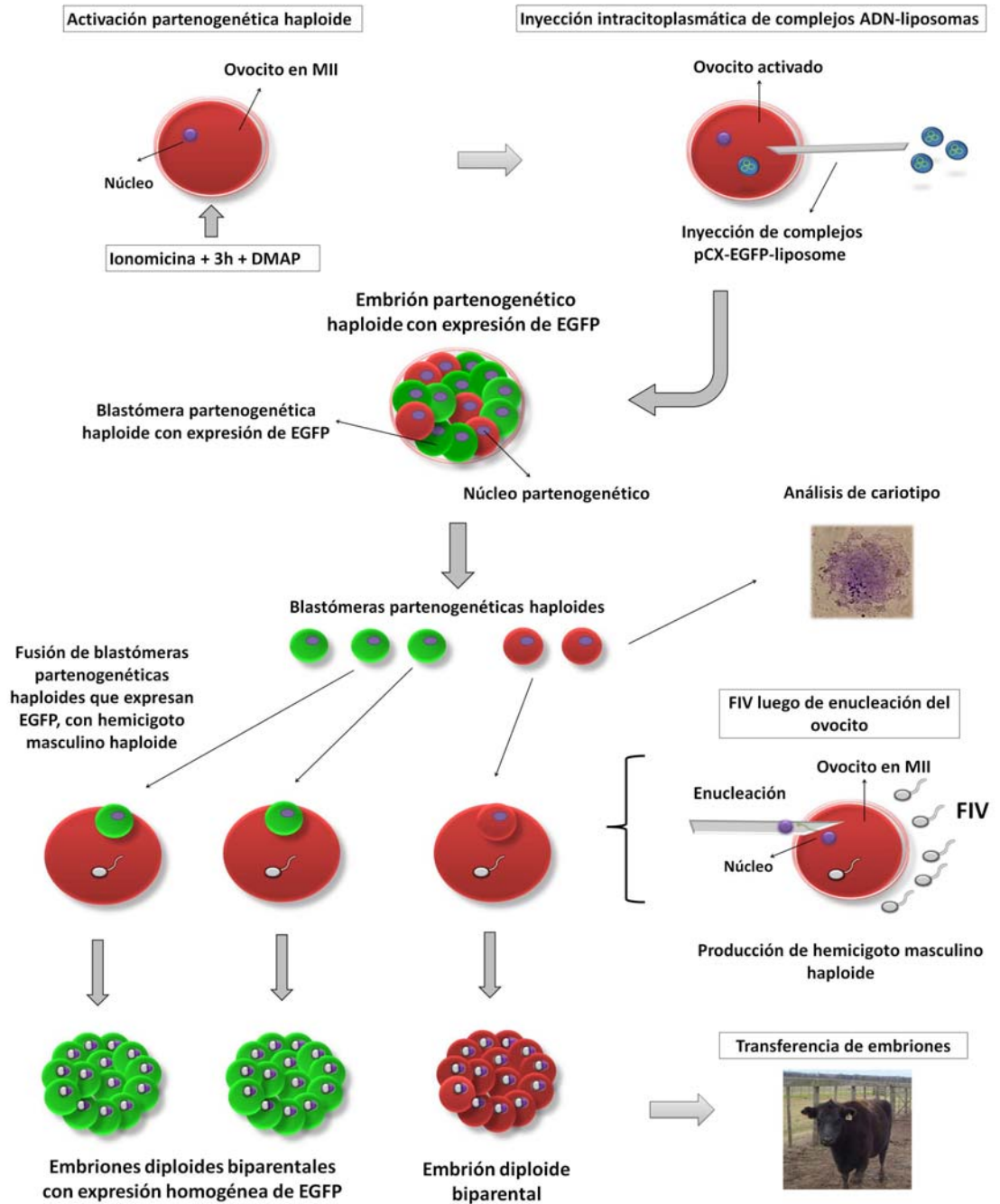


Figura 4.4.1. Diagrama explicativo de la producción de embriones partenogenéticos haploides y el procedimiento de reconstrucción de embriones biparentales.

4.5. RESULTADOS

Experimento 4.5.1. Desarrollo *in vitro* de embriones generados por activación partenogénica haploide, inyectados o no, con complejos pCX-EGFP-liposomas.

Las tasas de desarrollo y de expresión de EGFP de embriones partenogénicos son resumidas en la tabla 4.5.1. Diferencias estadísticas fueron observadas en las tasas de clivaje entre los grupos Io+3h+DMAP y el grupo Io, pero no con el grupo Io+3h+DMAP inyectado con pCX-EGFP-liposomas. No se observaron diferencias significativas en las tasas de blastocistos entre los grupos Io+3h+DMAP y Io+3h+DMAP inyectado con pCX-EGFP-liposomas, pero sí se observaron entre los grupos Io+3h+DMAP y Io. Todos los grupos de activación partenogénica haploide mostraron diferencias estadísticas en la tasa de blastocistos en comparación al grupo control de activación partenogénica diploide 40,2% (49/122) pero no se observaron diferencias en las tasas de clivaje. El patrón de expresión de EGFP fue evaluado en embriones clivados a día 3 post activación. Embriones partenogénicos haploides obtenidos mediante el tratamiento Io+3h+DMAP y posteriormente inyectados con complejos pCX-EGFP-liposomas mostraron una tasa de expresión de EGFP del 54,7% (35/54). Sin embargo, el análisis de cariotipo de los embriones partenogénicos generados por Io+3h+DMAP, confirmó que el 83,3% (10/12) de ellos fueron efectivamente haploides. El resto de los embriones fueron mixoploides. El análisis de cariotipo realizado sobre los hemicigotos masculinos confirmó que el 80% (8/10) de ellos fueron haploides. El resto de los presuntos hemicigotos masculinos fueron diploides.

Tabla 4.5.1. Desarrollo de embriones partenogénéticos haploides y expresión del transgen (*egfp*).

Tratamiento de activación partenogénica haploide	Réplicas	Inyección de pCX-EGFP-Liposomas	n	Clivaje (%)	Morulas (%)	Blastocistos (%)	Embriones que expresaron EGFP (%)
Io	3	-	67	15 (22,4) ^a	1 (1,5) ^a	0 (0) ^a	NA
Io+3h+DMAP	3	-	118	103 (87,3) ^b	23 (19,4) ^b	15 (12,8) ^b	NA
Io+3h+DMAP	3	+	64	54 (84,4) ^b	33 (51,6) ^c	7 (10,9) ^b	35 (54,7)
Control de activación diploide (Io+DMAP)	3	-	122	108 (88,5) ^b	53 (43,4) ^c	49 (40,2) ^c	NA

(a,b,c) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Experimento 4.5.2. Desarrollo y expresión transgénica de embriones biparentales reconstruidos por fusión de blastómeras haploides partenogénicas (expresando o no, EGFP) con hemicigotos masculinos.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la tabla 4.5.2. No se observaron diferencias estadísticas en las tasas de fusión y desarrollo, entre embriones biparentales reconstruidos con blastómeras partenogénicas que expresaron o no el transgen (Figura 4.5.1), mientras que los controles biparentales de FIV mostraron una tasa significativamente alta de blastocistos. Todos los embriones reconstruidos con blastómeras partenogénicas que expresaron EGFP, expresaron el transgen durante su desarrollo (100 %, 29/29), y el 96,6 % de ellos mostró expresión en todas sus blastómeras (Figura 4.5.2). El análisis inmunocitoquímico para determinar el patrón de expresión de Oct-4 en los blastocistos analizados (n=2), fue positivo tanto en el MCI como en el trofoblasto. El mismo resultado se obtuvo al analizar blastocistos control generados por FIV (n=3). Para determinar el número de células de los blastocistos reconstruidos (n=6) y los blastocistos control de FIV (n=8), éstos fueron teñidos a día 8 de cultivo *in vitro*, resultando en un número promedio de $72,8 \pm 7$ y $97 \pm 7,3$ células, respectivamente.

Tabla 4.5.2. Desarrollo y expresión del transgen (*egfp*) en embriones reconstruidos por fusión de hemicigotos masculinos y blastómeras partenogenéticas haploides.

Método de producción	Réplicas	Blastómera Partenogenética	n	Fusionados	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP (%)	Embriones +EGFP en todas sus células %
Reconstrucción de embriones biparentales	4	- EGFP	146	131 (89,7)	80 (61,1)	11 (8,4) ^a	NA	NA
	2	+ EGFP	38	37 (97,4)	29 (78,4)	4 (10,8) ^{ab}	29 (100)	28/29 (96,6)
Control biparental de FIV	4	- EGFP	98	NA	63 (64,3)	22 (22,5) ^b	NA	NA

(a,b) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, Positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

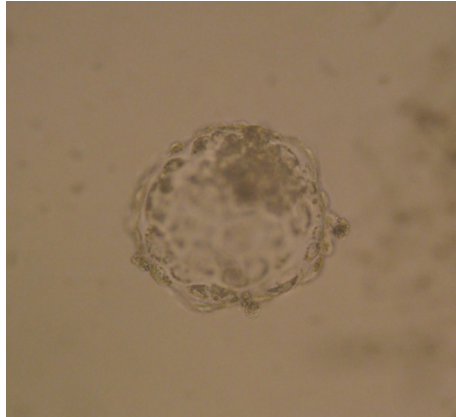


Figura 4.5.1. Blastocisto biparental bovino producido por fusión de una blastómera haploide partenogenética con un hemicigoto masculino y cultivado en el sistema WOW. (Magnificación original 200x).

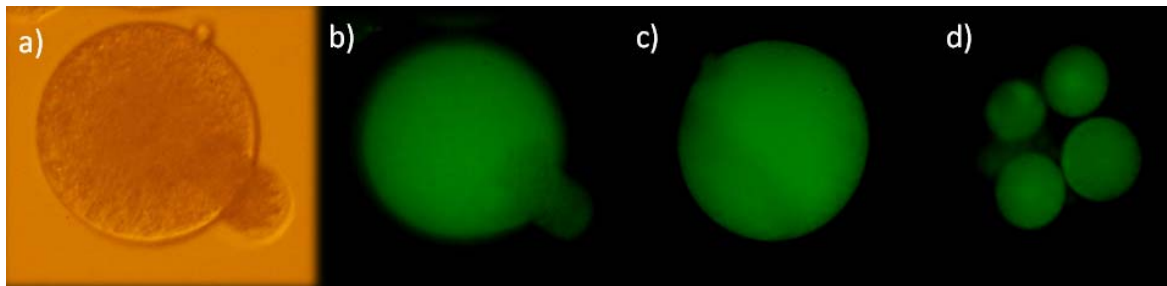


Figura 4.5.2. Reconstrucción de embriones biparentales a) Hemicigoto masculino libre de ZP, fusionándose con una blastómera partenogenética expresando EGFP. b) El mismo hemicigoto masculino libre de ZP, fusionándose con una blastómera partenogenética expresando EGFP, iluminado con luz azul. c) El mismo hemicigoto masculino libre de ZP, completamente fusionado con una blastómera partenogenética expresando EGFP e iluminado con luz azul. d) Embrión biparental reconstruido, expresando el transgen en todas sus blastómeras. La fluorescencia fue evaluada bajo luz azul (488 nm; magnificación original 200x).

Transferencia embrionaria

Embriones reconstruidos fueron transferidos en estadio de blastocisto (n=2), en vacas receptoras de raza Angus. Una preñez fue detectada mediante palpación de membrana fetal a los 60 días posteriores a la transferencia embrionaria. La preñez luego aborto.

4.6. DISCUSIÓN

La generación de embriones partenogénéticos haploides permite obtener blastómeras que son consideradas copias idénticas del genoma de un único ovocito (Surani y col., 1986; Escribá y col., 2001). En éste trabajo, inicialmente evaluamos dos métodos para generar embriones partenogénéticos haploides: Io y Io+3h+DMAP. Los embriones partenogénéticos haploides producidos por exposición únicamente con Io, mostraron bajas tasas de clivaje y no produjeron blastocistos. Sin embargo, los embriones partenogénéticos generados por Io+3h+DMAP clivaron y desarrollaron exitosamente, independientemente de haber sido inyectados o no con complejos pCX-EGFP- liposomas (Tabla 4.5.1). Ambos grupos mostraron diferencias significativas con respecto al control partenogénético diploide, pero solo en la tasa de blastocistos. Estos resultados concuerdan con reportes previos, en los cuales el desarrollo de embriones partenogénéticos haploides fue significativamente inferior al de embriones partenogénéticos diploides en diferentes especies como bovinos, murinos y porcinos (Lagutina y col., 2004; Kaufman y col., 1983; Henery y col., 1992; Van 297 De Velde y col., 1999). Recientemente demostramos que la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas genera embriones de FIV y partenogénéticos, con expresión eficiente de genes exógenos (Vichera y col., 2010). En éste trabajo los embriones partenogénéticos haploides, producidos por Io+3h+DMAP, clivaron eficientemente y también mostraron altas tasas de expresión de EGFP tras la inyección de complejos pCX-EGFP- liposomas (Tabla 4.5.1).

En el segundo experimento, se demostró que es posible reconstruir embriones bovinos biparentales, utilizando como donantes de genomas femeninos blastómeras de embriones partenogénicos haploides de hasta 16 células (Tabla 4.5.2). Además, se obtuvieron tasas eficientes de fusión (90%), independientemente del estadio embrionario de las células donantes de genoma (4-16 células) y los embriones generados fueron capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto (Figura 4.5.1). Un reporte previo en ratón, observó que la transferencia nuclear del genoma materno tras la cuarta división celular o mayor, a hemicingotos masculinos, afectó severamente la capacidad de desarrollo de los embriones reconstruidos (Surani y col., 1986). Esto podría ser debido a la existencia de una asincronía entre ambos genomas parentales, dificultando la integración funcional de ambos núcleos.

Todos los embriones biparentales reconstruidos con blastómeras que expresaban EGFP expresaron el transgén (100%) y la mayoría de ellos lo expresaron en todas sus blastómeras (96,6%). En este experimento no se observaron diferencias estadísticas en el desarrollo de los embriones reconstruidos, sugiriendo que la expresión del transgen no afecta el desarrollo *in vitro* de los embriones. Mediante la expresión de EGFP en los embriones reconstruidos se verificó la contribución citoplasmática de las blastómeras partenogénicas donantes de genoma femenino (Figura 4.5.2). Por otro lado, la expresión de Oct-4 observada tanto en el MCI como en el trofoblasto de los blastocistos reconstruidos, fue consistente con una apropiada reprogramación nuclear, coincidiendo con lo reportado en estudios previos (Kirchhof y col., 2000). En este estudio se encontraron diferencias estadísticas en el número de células, entre blastocistos biparentales reconstruidos y blastocistos control de FIV. Estas diferencias indican que la velocidad de división celular podría verse afectada por el procedimiento de reconstrucción de embriones.

La transferencia de los embriones reconstituidos, en estadio de blastocisto, resultó en una preñez que luego abortó. Reportes previos realizados en ratones mostraron que se puede producir descendencia viable por transferencia de núcleos partenogénéticos haploides (Surani y col., 1986). Las crías producidas por esta técnica no fueron idénticas entre ellas ni a sus padres, ya que la variabilidad está dada por las contrapartes parentales. También se obtuvo descendencia viable a partir de quimeras reconstruidas por agregación de embriones bovinos partenogénéticos y de FIV (Boediono y col., 1999). En el conejo, la transferencia oviductal de cigotos reconstruidos, resultó en un 100% de preñez a día 12, pero no se diagnosticaron preñeces al día 21 luego de la ovulación (Escribá y col., 2001). Un año después, los mismos autores obtuvieron descendencia viable cuando los embriones biparentales fueron reconstruidos a partir de embriones partenogénéticos haploides de conejo (García-Ximénez y col., 2002). Estos resultados indicaron que la información genética de las gametas femeninas puede ser preservada exitosamente a partir de la criopreservación de embriones haploides partenogénéticos. La criopreservación del germoplasma hace posible el establecimiento de bancos genéticos para la conservación de la biodiversidad contribuyendo a la preservación de especies amenazadas. En el futuro, la criopreservación de embriones haploides partenogénéticos podría ser una opción muy atractiva para maximizar la conservación de recursos genéticos, debido a su mayor capacidad de resistencia a la criopreservación en comparación con los ovocitos.

En este trabajo, demostramos que es posible multiplicar el genoma haploide de ovocitos y que estas replicas pueden ser utilizadas para generar embriones bovinos biparentales. Futuras investigaciones deberían considerar la generación de líneas celulares

partenogénicas haploides como una fuente alternativa de gametas femeninas. Líneas celulares haploides estables han sido generadas en anfibios e insectos (Freed y col., 1970; Debecy col., 1984). Más recientemente, la generación de células madre embrionarias haploides fueron descritas en el pez Mekada (Yi y col., 2009). Esto tendría el potencial para generar una cantidad ilimitada de embriones biparentales combinando estas células haploides femeninas con hemicigotos masculinos haploides creando así una nueva combinación de rasgos genéticos de ambos padres.

En conclusión, hemos demostrado que es posible obtener un consistente número de replicas del genoma haploide bovino a partir de un único ovocito, y posteriormente utilizar estas replicas para generar embriones biparentales. Este método ofrece un enorme potencial en producción ganadera debido a que mediante la utilización de marcadores genéticos, ciertos atributos favorables podrían ser seleccionados previamente a la reconstrucción de los embriones biparentales. La reconstrucción de embriones biparentales por fusión de replicas del genoma de un ovocito, también podría incrementar la producción de animales transgénicos debido a que además de aumentar el número de embriones transgénicos producidos a partir de un único ovocito, esta técnica también genera embriones con una alta tasa de expresión homogénea del transgen. Futuras investigaciones son requeridas para determinar la eficiencia de integración y el número de inserciones de ADN exógeno obtenidos por esta técnica.

CAPITULO V

**FRAGMENTACIÓN DE ADN, EXPRESIÓN TRANSGÉNICA Y
DESARROLLO EMBRIONARIO TRAS INYECCIÓN
INTRACITOPLASMÁTICA DE COMPLEJOS ADN EXÓGENO-
LIPOSOMAS EN CIGOTOS BOVINOS DE FIV**

Gabriel Vichera, Lucia Moro, Carla Buemo y Daniel Salamone

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos
Aires, Av. San Martín 4453, C1417 Buenos Aires, Argentina.

Trabajo publicado en la revista *Zygote*, 2012, Oct 1:1-9.

5.1. RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar la calidad y viabilidad de embriones bovinos de FIV tras ser inyectados con complejos pCX-EGFP-liposomas o pBCKIP2.8-liposomas (plásmido que codifica el gen de la insulina humana acompañado con liposomas, HI-LC). En el experimento 1, evaluamos el desarrollo embrionario y la expresión de EGFP en embriones de FIV inyectados con ambos plásmidos de manera individual. Las tasas de clivaje de pCX-EGFP-liposomas, HI-LC, embriones de FIV inyectados solamente con liposomas (FIV-L) y controles FIV fueron 62% (63/102), 67% (67/100), 66% (67/101) y 79% (98/124); las tasas de blastocistos fueron 17% (17/102), 21% (21/100), 21% (21/101) y 23% (28/124), respectivamente. Los porcentajes de embriones +EGFP fueron 42,9% a los 3 días de cultivo y 41,8% en estadio de blastocisto. En el segundo experimento los blastocistos obtenidos después de la inyección de pCX-EGFP-liposomas, +EGFP o -EGFP, fueron analizados mediante ensayo de TUNEL a día 6 (Bd6), 7 (Bd7) y 8 (Bd8) de cultivo para evaluar el efecto del transgen y la duración del cultivo sobre la fragmentación del ADN. Todos los blastocistos +EGFP mostraron células TUNEL positivas (+T) en Bd6, Bd7 y Bd8 (91%, 73,7% y 99,5%, respectivamente). En cambio, blastocistos -EGFP mostraron bajas tasas de núcleos fragmentados (0%, 44,6% y 85%, respectivamente). Blastocistos obtenidos de los grupos FIV-L y FIV-C también fueron evaluados. En estos dos grupos no se encontraron evidencias de fragmentación de ADN en Bd6 y Bd7, pero si se encontraron células +T en Bd8 (66,4% y 85,8%, respectivamente). En el tercer experimento, blastocistos bovinos obtenidos del grupo HI-LC fueron transferidos a vacas receptoras tras 6 (n=11), 7 (n=5) y 8 (n=5) días de cultivo post FIV. Las preñeces obtenidas fueron de Bd6 [2/11 (18,2%)] y Bd7 [2/5 (40%)]. Dos preñeces desarrollaron a término, una derivada de Bd6 y otra de Bd7. Mediante análisis de PCR se determinó que ninguno de los terneros nacidos fue transgénico. En resumen, podemos afirmar que embriones bovinos de FIV pueden ser fácilmente transfectados tras ser inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas y que la técnica no afecta las tasas de desarrollo embrionario *in vitro*. A mayor duración del cultivo mayor es el porcentaje de núcleos fragmentados. Por otra parte, este parámetro es mayor en blastocistos +EGFP respecto de blastocistos -EGFP. Finalmente más transferencias son necesarias para obtener la eficiencia real de esta nueva técnica.

5.2. INTRODUCCIÓN

Los animales transgénicos poseen un gran potencial de aplicación en la industria farmacéutica, medicina humana y producción agropecuaria. (Wilmot y col., 1990; Stice y col., 1998; Bondioli y col., 2001; Golovan y col., 200; Salamone y col., 2006). Recientemente se ha desarrollado una nueva estrategia para generar embriones bovinos transgénicos de FIV (Vichera y col., 2010); esta técnica consiste en la inyección intracitoplasmática de liposomas conteniendo ADN exógeno en ovocitos maduros y cigotos generados por FIV. A diferencia de la microinyección pronuclear, este método evita la centrifugación de los cigotos y también la inserción de la pipeta dentro del pronúcleo (Chauhan y col., 1999; Murakami y col., 1999). De esta forma es técnicamente más sencilla que la microinyección pronuclear e incrementa el número de cigotos que pueden ser transfectados en el mismo periodo de tiempo.

Reportes previos sobre microinyección pronuclear o inyección citoplasmática plantean que estos procedimientos causan rupturas espontáneas en cromosomas (Brinster y col., 1985; Yamahuchi y col., 2007). Sin embargo, también se ha demostrado que el potencial de desarrollo de embriones tempranos con poca fragmentación de ADN, no difiere de embriones carentes de fragmentación (Alikani y col., 2000; Mateusen y col., 2005); si bien pueden dar lugar a una gran proporción de pérdidas de preñez. Nuestra hipótesis radica en que los embriones bovinos de FIV que expresan un transgen, incrementan el nivel de fragmentación nuclear, y que esta fragmentación también se ve aumentada con la duración del cultivo.

Este estudio fue llevado a cabo para evaluar la calidad de embriones de FIV tras ser inyectados con complejos pCX-EGFP–liposomas o pBCKIP2.8-liposomas (plásmido que codifica para el gen de pro-insulina humana). Nosotros evaluamos el desarrollo embrionario en ambos tratamientos y la fragmentación del ADN en blastocistos bovinos que expresan o no EGFP a diferentes días de cultivo (día 6, 7, 8). Finalmente, blastocistos bovinos de FIV inyectados con complejos pBCKIP2.8–liposomas fueron transferidos a vacas recipientes tras 6, 7 y 8 días de cultivo con el fin de evaluar su capacidad de implantar y su desarrollo post implantación.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Reactivos

Ídem 2.3.1.

5.3.2. Colección de ovocitos y maduración *in vitro*

Ídem 2.3.2.

5.3.3. Fertilización (FIV)

Semen bovino congelado fue descongelado en agua a 37°C por 30 s. El semen fue centrifugado dos veces (490 g x 5 min) en medio BO suplementado con 5 mM de cafeína (C4144) y 20 UI/ml de heparina (H3149). El pellet obtenido se diluyó a la mitad con medio BO conteniendo 10 mg/ml de albúmina bovina libre de ácidos grasos (A6003), resultando en una concentración final de espermatozoides de 12-15 x10⁶ /ml. Con esta dilución se hicieron gotas de 100 µl y se cubrieron con aceite mineral. Luego de la maduración, los

COCs se lavaron en 3 ml de TALP-H y se colocaron en grupos de 30 en la suspensión de espermatozoides. Ambas gametas fueron coincubadas durante 5 h en iguales condiciones que para la maduración. Los presuntos cigotos fueron lavados 3 veces en TALP-H y cultivados como se describe a continuación.

5.3.4. Construcción de ADN

Los plásmidos utilizados fueron pCX-EGFP, el cual contiene *egfp* controlado bajo un promotor quimera de citomegalovirus y β -actina de pollo (Ikawa y col., 1995) y el plásmido pBCKIP2.8 el cual codifica para el gen de la insulina humana bajo control de un promotor β -caseína. En este trabajo utilizamos plásmido circular, ya que previamente hemos reportado la producción de una vaca transgénica utilizando una construcción circular (Salamone y col., 2006).

5.3.5. Coincubación de ADN y liposomas

Para los ensayos de inyección de complejos ADN exógeno-liposomas, se coincubaron durante 15 min 1 μ l de ADN (4 μ g/ml) con 3 μ l de liposomas comercial (Fugene; Boehringer-Manheim, Germany). La mezcla de liposomas y ADN fue diluida a la mitad de concentración con 10% de polyvinylpyrrolidona (PVP, 99219; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), alcanzando una concentración final de ADN de 0,5 μ g/ml.

5.3.6. Inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas

Después de 15 h post FIV, presuntos cigotos fueron inyectados con aproximadamente 2 pl de complejos ADN exógeno-liposomas/PVP, utilizando un capilar de inyección (0,7 μ M de

diámetro) en un micromanipulador (Medical Systems, Great Neck, NY, USA) montado en un microscopio Nikon Eclipse E-300 (Nikon, Melville, NY, USA).

5.3.7. Cultivo *in vitro*

Ovocitos fertilizados fueron cultivados en gotas de 100 µl de medio SOF (Tervit y col., 1972; modificado por Holm y col., 1999) suplementado con 2,5% v/v de SFB, en una atmósfera humidificada de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ en aire, a 39°C. Durante el cultivo embrionario, el medio fue suplementado con 10% SFB a día 5. El clivaje fue evaluado a día 2 y la tasa de blastocistos a día 6, 7 y 8 de cultivo post FIV.

5.3.8. Determinación de fluorescencia (EGFP) en embriones

Durante el cultivo *in vitro*, los embriones fueron brevemente expuestos a luz azul utilizando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 530 nm, para determinar la expresión de EGFP a diferentes estadios de desarrollo. Embriones fueron analizados a día 3 (clivados) y 6-8 (blastocistos), posterior a FIV.

5.3.9. Microscopía Confocal y Ensayo de TUNEL

La fragmentación del ADN fue evaluada utilizando el sistema DeadEndTM Fluorometric (TUNEL; Promega G3250, Madison, USA). Los embriones fueron fijados en paraformaldehído 4% en PBS y lavados en solución BSA (1 mg BSA/ml DPBS). Después de los lavados, los embriones fueron permeabilizados con 0,5% Triton X-100 en DPBS por 15 min a temperatura ambiente y lavados nuevamente en solución BSA. Fragmentación generalizada de ADN fue inducida en los controles positivos, por incubación con 50 U/ml DNasa (RQ1; Promega; Madison, WI, USA) en forma previa a la reacción de TUNEL. Los

controles negativos fueron generados por omisión de la enzima terminal transferasa en la reacción. Posteriormente a tres lavados en solución BSA, las muestras y los controles positivos fueron incubados en fluoresceína-dUTP y deoxinucleotidil transferasa terminal por 2 h a 39°C en oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio durante 30 min a temperatura ambiente. Los embriones fueron lavados en solución BSA y montados entre porta y cubreobjetos en glicerol 70%. Los embriones fueron analizados en un microscopio laser confocal Nikon. Se utilizo un filtro de excitación de 488 nm para detección de fluoresceín-12-dUTP y un filtro de 544 nm para detectar el yoduro de propidio. Las imágenes fueron grabadas cada 1,5–2 μm del eje Z de cada embrión. Imágenes en 3 dimensiones fueron construidas utilizando el software EZ-C1 3.9. Se determinó el número total de células y el número de núcleos con fragmentación de ADN.

5.3.10. Transferencia embrionaria

Blastocistos bovinos fueron transferidos a 21 vacas recipientes a día 6, 7 y 8 de cultivo. Cada blastocisto fue lavado varias veces en medio TALP-H y cargados en pajuelas de 0,25 ml. En menos de 3 h los embriones fueron transportados al lugar en donde se realizaron las transferencias manteniendo su temperatura a 35°C. Los embriones fueron transferidos no-quirúrgicamente al cuerno uterino ipsilateral al ovario que portaba el cuerpo lúteo. Cada vaca recipiente recibió un blastocisto. Las preñeces fueron detectadas por ultrasonografía (7,5 MHz lineal transducer; Aloka Co, Tokyo, Japan) a los 23 días posteriores a la transferencia.

5.3.11. Extracción de ADN y análisis de PCR

El ADN genómico bovino fue aislado a partir de sangre y de tejido de la oreja, de acuerdo a las instrucciones de extracción del Kit (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, WI, USA). Para el ensayo de detección del transgen (insulina) por PCR, se utilizaron diferentes diluciones de ADN genómico (1/10, 1/100, 1/1000). La reacción de PCR consistió en: 10X PCR Buffer, 50mM MgCl₂; 3mM IP Fwd y Rev; 10mM dNTPs; y Taq 500U/ml. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de amplificación cada uno incluyendo un ciclo de desnaturalización (94°C por 30 s), alineamiento (60°C por 30s), y extensión (72°C por 30s). El ciclo N° 40 contuvo una extensión adicional a 72°C por 3 min. Los cebadores utilizados fueron: Reverse IP GGAAGCATGGAGTCTTGGAC y Forward IP GGGAGGTGAAGGTTTTCA. Como control positivo se utilizó el plásmido pBCKIP2.8, el cual amplifica un fragmento del gen de la insulina de 700pb. Como control negativo se utilizó agua estéril en vez de ADN. El producto de PCR (10 ul) fue analizado en un gel de agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. Las bandas de ADN amplificadas fueron visualizadas bajo luz UV.

5.3.12. Análisis estadístico

El desarrollo embrionario *in vitro* y la expresión del transgen fue comparada por el test no paramétrico de Fisher. Diferencias en el número total de células y el número de núcleos fragmentados fueron analizadas utilizando un test de diferencias de proporciones. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS (SAS Institute, 1989). Diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0,05$.

5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el primer experimento cigotos generados por FIV fueron inyectados (16 h post fertilización) con dos complejos ADN exógeno-liposomas diferentes. Los plásmidos utilizados fueron pCX-EGFP que codifica el gen *egfp* y pBCKIP2.8 que codifica el gen de la insulina humana. El desarrollo embrionario fue evaluado en ambos grupos. En el primer grupo además se evaluó el patrón de expresión de EGFP en embriones clivados y blastocistos (día 3 y 7 post fertilización, respectivamente). Los grupos control consistieron en embriones de FIV, inyectados con liposomas libres de plásmidos y embriones de FIV que no fueron inyectados. En el segundo experimento, para determinar la presencia de fragmentación de ADN, blastocistos obtenidos en todos los grupos que expresaban o no EGFP fueron analizados por ensayo de TUNEL a día 6, 7 y 8 de cultivo. Para el ensayo de TUNEL se realizaron los siguientes controles: Un control positivo que consistió en blastocistos con fragmentación de ADN generalizada, inducida por incubación con 50 U/ml de DNasa y un control negativo generado tras la omisión de la enzima transferasa terminal en la reacción de TUNEL. Finalmente, los blastocistos bovinos de FIV obtenidos luego de la inyección intracitoplasmática de complejos pBCKIP2.8-liposomas fueron transferidos a vacas receptoras luego de 6, 7 y 8 días de cultivo.

5.5. RESULTADOS

Experimento 5.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP luego de la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en cigotos bovinos generados por FIV.

En este experimento evaluamos el desarrollo de embriones bovinos generados por FIV inyectados con complejos pCX-EGFP-liposomas o pBCKIP2.8-liposomas (Tabla 5.5.1). No se observaron diferencias estadísticas en las tasas de clivaje, blastocistos y blastocistos expandidos entre los diferentes tratamientos. Además, se observaron altos porcentajes de embriones +EGFP a día 3 y 7 de cultivo (Figura 5.5.1).

Tabla 5.5.1. Desarrollo embrionario y expresión de EGFP luego de la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas en cigotos bovinos generados por FIV.

Tratamiento	n	Embriones Clivados (%)	Embriones Clivados + EGFP (%)	Blastocistos (%)	Blastocistos Expandidos (%)	Blastocistos + EGFP (%)
FIV- Complejos pCX-EGFP-liposomas	102	63 (61,8)	27/63 (42,9)	17 (16,7)	9 (8,8)	7/17 (41,8)
FIV- Complejos pBCKIP2.8-Liposomas	100	67 (67)	NA	21 (21)	18 (18,0)	NA
FIV- Control Liposomas	101	67 (66,3)	NA	21 (20,8)	16 (15,8)	NA
FIV-Control	124	98 (79)	NA	28 (22,6)	18 (14,5)	NA

Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher). +, Positivo; EGFP, proteína verde fluorescente; FIV, fertilización. NA, no aplicable.

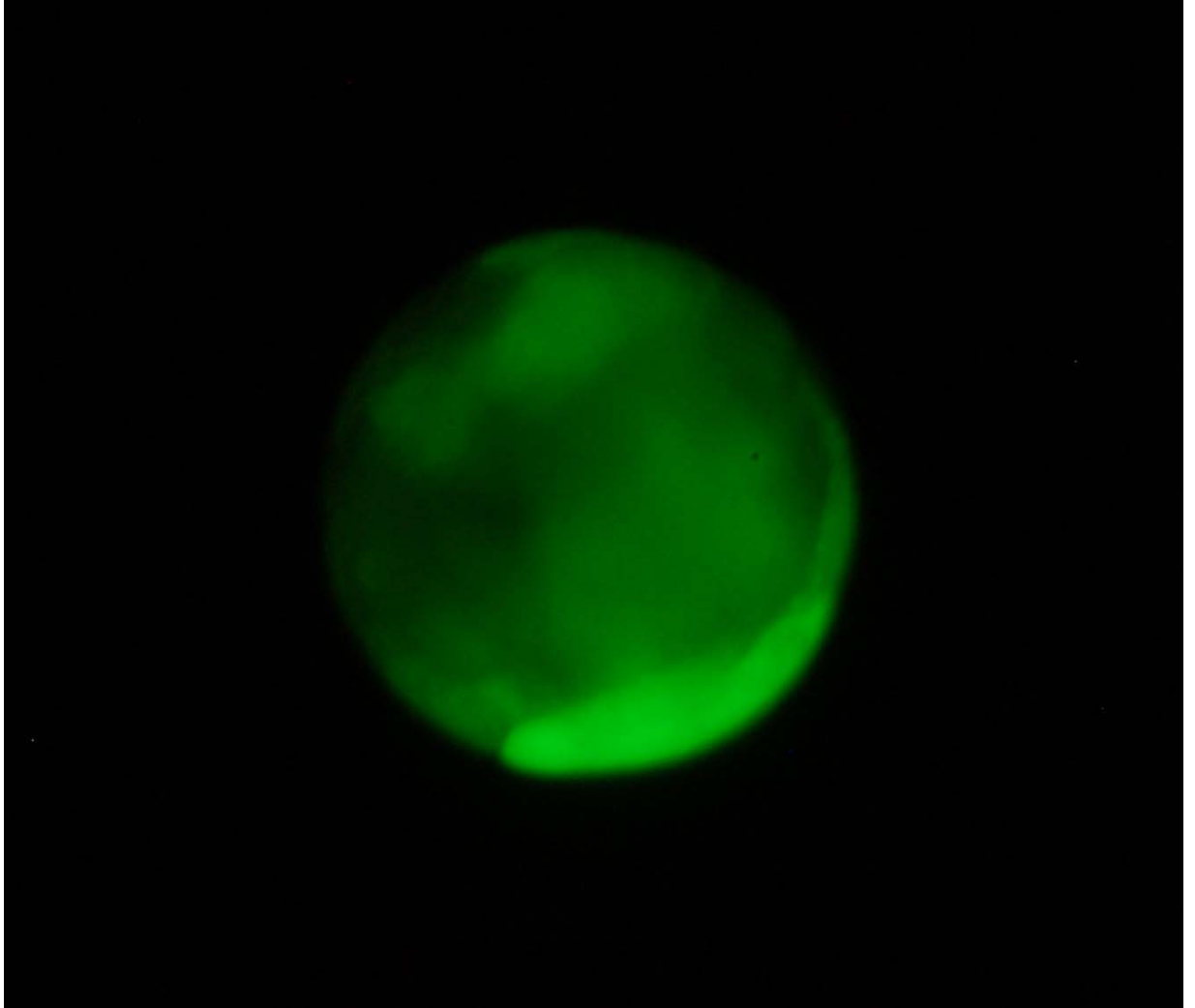


Figura 5.5.1. Blastocisto + EGFP generado por FIV e inyección intracitoplasmática de complejos pCX-EGFP-liposomas. La fluorescencia fue evaluada bajo luz azul (488 nm; magnificación original X200).

Experimento 5.5.2. Fragmentación de ADN en blastocistos bovinos generados por FIV e inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas, evaluados por ensayo TUNEL (Bd6, Bd7 y Bd8).

Los blastocistos obtenidos luego de la inyección de complejos pCX-EGFP-liposomas, que expresaban o no el transgen, y los grupos control fueron evaluados por ensayo TUNEL para determinar la presencia de núcleos fragmentados a día 6, 7 y 8 de cultivo embrionario (Figura 5.5.2). El número total de células y de células +T, fue determinado en todos los blastocistos. Los blastocistos incubados con DNasa (control positivo) mostraron marcación +TUNEL en casi la totalidad de los núcleos. Por otra parte, ninguno de los núcleos fueron marcados +TUNEL en los blastocistos incubados sin la enzima TdT (control negativo). No se evidenció fragmentación de ADN en los grupos control de FIV o FIV-L, a día 6 y 7 de cultivo. Sin embargo, células +T fueron detectadas en blastocistos de día 8 en ambos grupos (85,8% y 66,4%, respectivamente $p < 0,05$). Todos los blastocistos que expresaban EGFP mostraron núcleos +T a día 6, 7 y 8 de cultivo. Todos los blastocistos que fueron inyectados con complejos pCX.EGFP-liposomas que no expresaron el transgen, mostraron estadísticamente menor cantidad de núcleos fragmentados respecto a embriones con expresión de EGFP. Además, en este grupo no se observaron células +T en blastocistos obtenidos tras 6 días de cultivo. En la tabla 5.5.2 se detalla el porcentaje de células +T respecto del número total de células en todos los grupos.

Tabla 5.5.2. Fragmentación de ADN en blastocistos bovinos generados por FIV e inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas, evaluados por ensayo TUNEL (día 6, 7 y 8).

Blastocistos	Tratamiento	Expresión EGFP	n	Blastocistos con células TUNEL +	Células totales de los blastocistos	Células TUNEL+ totales	% TUNEL+ / Células Totales
Día 6	FIV- Complejos pCX-EGFP-Liposomas	+	2	2	111	101	91 a/ α
	FIV- Complejos pCX-EGFP-Liposomas	-	2	0	94	0	0 b/ α
	FIV- Control Liposomas	NA	2	0	276	0	0 b/ α
	FIV-Control	NA	4	0	447	0	0 b/ α
Día 7	FIV- Complejos pCX-EGFP-Liposomas	+	2	2	152	112	73,7 α/β
	FIV- Complejos pCX-EGFP-Liposomas	-	4	4	372	166	44,6 b/ β
	FIV- Control Liposomas	NA	4	0	728	0	0 c/ α
	FIV-Control	NA	5	0	677	0	0 c/ α
Día 8	FIV- Complejos pCX-EGFP-Liposomas	+	3	3	191	190	99,5 a/ Ω
	FIV- Complejos pCX-EGFP-Liposomas	-	3	3	147	125	85 b/ Ω
	FIV- Control Liposomas	NA	4	4	233	200	85,8 b/ β
	FIV-Control	NA	7	7	988	656	66,4 γ/β

Valores de tratamientos (dentro del mismo día de blastocisto) con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes (Test de diferencias de proporciones, $P < 0,05$). (α, β, Ω) Valores del mismo tratamiento (entre diferentes días de blastocisto) con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes (Test de diferencias de proporciones, $P < 0,05$). TUNEL +, TUNEL positivo. pCX-EGFP, plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente; FIV, fertilización. NA, no aplicable.

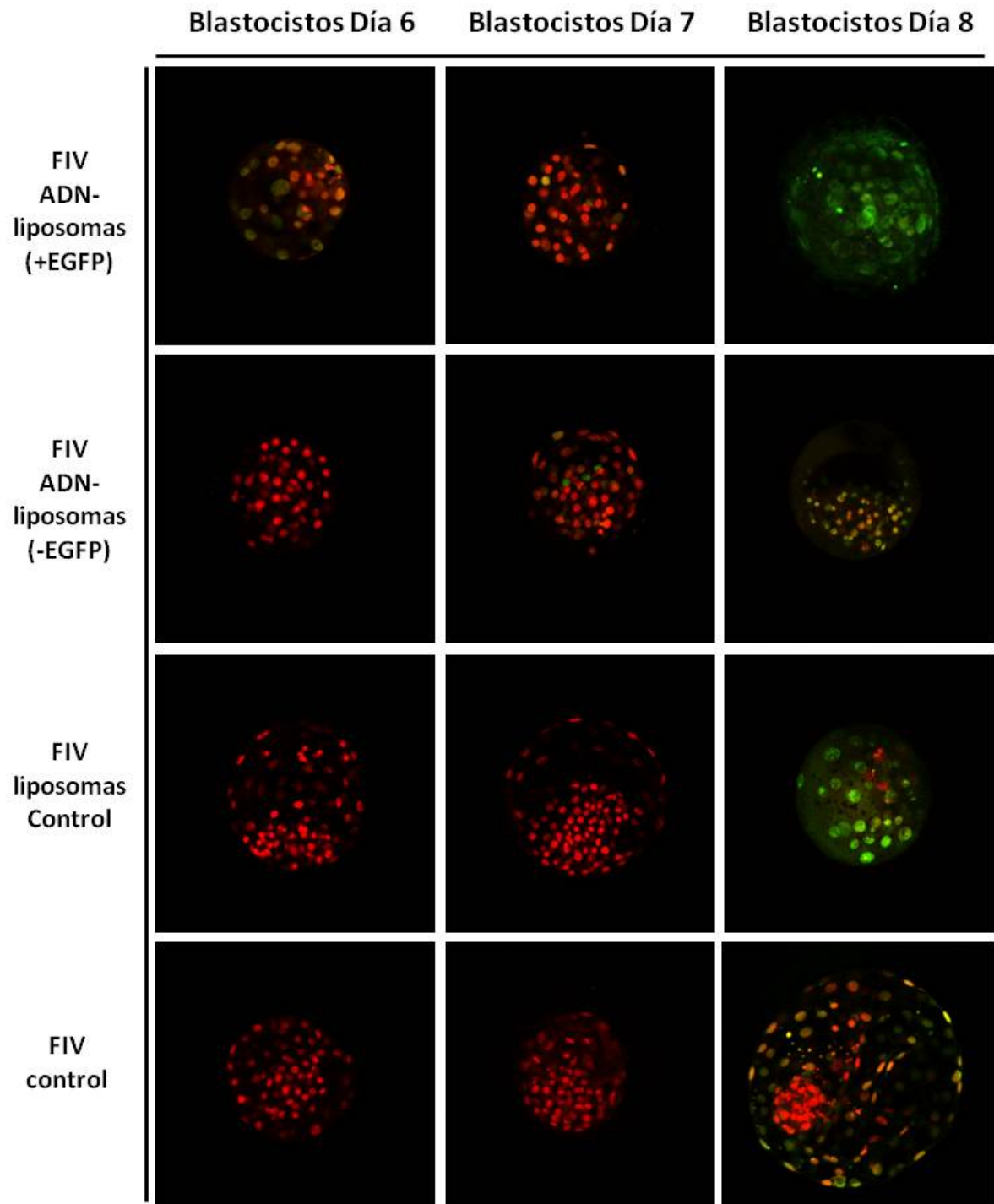


Figura 5.5.2. Blastocistos de día 6, 7 y 8 producidos por FIV e inyección intracitoplasmática de complejos pCX-EGFP-liposomas, analizados por ensayo de TUNEL para determinar la presencia de fragmentación de ADN. Células + TUNEL fueron marcadas con fluoresceína-12-dUTP (verde) y los núcleos fueron contrastados con yoduro de propidio (rojo). +, positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente; FIV, fertilización. (Magnificación original X200).

Experimento 5.5.3. Transferencia embrionaria, Preñeces y Nacimientos de vacas generadas por FIV.

Con el objetivo de determinar la influencia de la duración del cultivo embrionario en las tasas de preñes y nacimientos, se comparó la transferencia de Bd6, Bd7 y Bd8 que fueron previamente inyectados con un plásmido codificando la pro-insulina. Dos de once vacas recipientes (18,2%) que recibieron blastocistos de día 6 fueron preñadas, mientras que 2/5 vacas recipientes (40%) preñaron tras la transferencia de Bd7. Ninguna de las recipientes que recibieron Bd8 preñaron. No se observaron diferencias estadísticas en las tasas de preñes entre los grupos. Para todos los tratamientos, cada recipiente recibió 1 blastocisto y las preñeces fueron detectadas por ultrasonografía, luego de 23 días desde la transferencia embrionaria. De las 4 recipientes preñadas, 2 desarrollaron a término, 1 derivada de transferencia de Bd6 (9,1%) y la otra derivada de transferencia de Bd7 (20%; Tabla 5.5.3; Figura 5.5.3). Análisis de PCR realizados a partir de sangre y muestras de tejido, determinaron que ninguno de los terneros fue transgénico para el gen de la insulina humana.

Tabla 5.5.3. Transferencia embrionaria de blastocistos bovinos de FIV, inyectados con complejos pBCKIP2.8-Liposomas

Transferencia Embrionaria	N	Preñeces (%)	Nacimientos (%)
Blastocistos día 6	11	2 (18,2)	1 (9,1%)
Blastocistos día 7	5	2 (40,0)	1 (20,0%)
Blastocistos día 8	5	0 (0)	0 (0%)
Blastocistos totales	21	4 (19)	2 (9,6)

Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$, test de Fisher).



Figura 5.5.3. Crías obtenidas a partir de embriones de FIV inyectados con complejos pBCKIP2.8-liposomas. Ninguno de los terneros fue transgénico para el gen de la insulina.

5.6. DISCUSIÓN

En este trabajo evaluamos la calidad y viabilidad de embriones bovinos obtenidos mediante FIV e inyectados con complejos ADN exógeno-liposomas. El ADN exógeno utilizado consistió en dos construcciones utilizadas en forma independiente: pCX-EGFP, que codifica el gen reportero *egfp* y pBCKIP2.8 que codifica el gen de pro-insulina humana. La utilización del primer plásmido permitió la fácil detección de la expresión del transgen. El segundo plásmido fue elegido con el objetivo de producir una vaca que exprese insulina en su leche, lo que potencialmente podría incrementar la cantidad de hormona disponible para los consumidores y disminuir los costos en la industria farmacéutica.

Los resultados confirmaron que la transfección puede llevarse a cabo de manera sencilla y efectiva utilizando este nuevo método. Además y de acuerdo con reportes previos (Vichera y col., 2010), nosotros demostramos que embriones +EGFP generados por esta técnica pueden desarrollar hasta estadio de blastocisto sin diferencias con los controles. Resultados similares en desarrollo fueron obtenidos cuando fue utilizado el plásmido conteniendo el gen de la insulina. Así, en este trabajo se ha demostrado que es posible la utilización de construcciones de interés biomédico sin ninguna disminución en el desarrollo embrionario tras ser inyectadas en cigotos de FIV.

En trabajos previos se ha demostrado que es posible obtener animales transgénicos utilizando diferentes metodologías, sin embargo todas ellas tienen diferentes inconvenientes y su eficacia continua siendo baja (Jaenisch, 1976; Hammer y col., 1985; Lavitrano y col., 1989; Krimpenfort y col., 1991; Schnieke y col., 1997; Chan y col., 1998; Cibelli y col., 1998; Perry y col., 1999). La mayoría de los trabajos en este campo se han focalizado en

mejorar la integración del transgen mientras que poca atención ha sido puesta en mejorar la calidad embrionaria (Wall, 2001; Gandolfi y col., 1996; Eyestone, 1999; Rideout y col., 2001). Las pérdidas embrionarias pueden resultar por rupturas en el ADN que pueden directamente desencadenar mecanismos apoptóticos. Trabajos previos han propuesto que la técnica de microinyección puede causar rupturas espontáneas de los cromosomas, y que estas pueden incrementar el número de sitios para la integración del transgen (Brinster y col., 1985; Yamahuchi y col., 2007). Por ejemplo, una correlación entre rupturas de cromosomas y expresión del transgen fue observada utilizando la técnica de ICSI-Tr (Szczygiel y col., 2003). Por esta razón es necesario establecer las condiciones apropiadas para mantener un correcto equilibrio entre integración, expresión del transgen y la preservación de la integridad del ADN en embriones, a fin de evitar pérdidas de preñeces.

En este trabajo, nosotros evaluamos la incidencia de fragmentación del ADN tras la inyección del transgen, la inyección de liposomas y la expresión de EGFP en blastocistos bovinos de FIV a día 6, 7 y 8, utilizando ensayo de TUNEL. Se observaron núcleos fragmentados en Bd8 control, pero no se observaron núcleos fragmentados en Bd6 y Bd7. Estos resultados difieren de los obtenidos por Matwee y col., (2000), en donde todos los blastocistos producidos tuvieron células apoptóticas. Uno de los grupos control consistió de cigotos inyectados con liposomas libres de ADN. El desarrollo de este grupo, fue similar al obtenido en el grupo control de FIV, y como se menciono previamente, no se detectaron núcleos fragmentados en Bd6 y Bd7. De estas observaciones nosotros concluimos que los liposomas no son perjudiciales para el desarrollo embrionario cuando son utilizados como vectores para la entrega de ADN exógeno.

Los blastocistos obtenidos a partir de cigotos inyectados con complejos pCX-EGFP-liposomas también fueron evaluados mediante ensayo de TUNEL, distinguiendo aquellos con expresión transgénica de los que no. Pudimos observar que todos los blastocistos que expresaban EGFP mostraron marcas positivas para el ensayo de TUNEL, mientras que los blastocistos sin expresión transgénica mostraron menor fragmentación de ADN. Esta observación junto con los resultados de desarrollo embrionario, mostraron que la expresión del transgen afecto la integridad del ADN, pero no así las tasas de desarrollo. Es importante destacar que la fragmentación de ADN está involucrada en el proceso de apoptosis, y esta cumple ciertas funciones durante el desarrollo embrionario preimplantatorio, como la eliminación de células anormales (Hardy, 1997; Betts y King, 2001). Sin embargo el desarrollo post implantatorio de estos embriones puede verse afectado en forma negativa cuando el proceso apoptótico se incrementa.

Luego de haber estudiado el desarrollo embrionario y la incidencia de la fragmentación de ADN, transferimos 21 blastocistos (1/ vaca recipiente) obtenidos a partir de cigotos inyectados con complejos insulina-liposomas a los 6, 7 y 8 días de cultivo. Se obtuvieron 4 preñeces luego de la transferencia de Bd6 y Bd7 pero no se detectaron preñeces de Bd8 transferidos. A pesar de no observarse diferencias estadísticas entre los grupos, parecería existir una correlación entre los embriones con el mayor porcentaje de células apoptóticas y la ausencia de preñez. Todo los Bd8 mostraron más del 66% de células +T, aún en los grupos control. Esto indicaría una mala calidad embrionaria, probablemente acrecentada por un extenso cultivo. En este trabajo demostramos que los blastocistos con menos de 8 días de cultivo, poseen un mayor potencial de desarrollo a término, luego de ser transferidos. Otros autores reportaron resultados similares luego de la transferencia de

embriones bovinos producidos *in vivo*, determinando que las mejores tasas de preñez se obtienen a partir de transferencias de Bd7 (Niemann y col., 1982).

Los animales que obtuvimos en este trabajo tras utilizar esta nueva técnica de transgénesis no portaron el gen de la insulina humana. A pesar de que confirmamos que es posible generar crías viables utilizando este método, se requiere un mayor número de transferencias para aumentar las probabilidades de integración del transgen.

En resumen, este estudio demuestra que embriones bovinos de FIV pueden ser fácilmente transfectados luego de la inyección de complejos ADN exógeno-liposomas. Con respecto a la evaluación de la fragmentación del ADN, parecería que cuanto más extenso es el cultivo, mayor es el porcentaje de núcleos fragmentados en los blastocistos. Además observamos que la fragmentación aumenta en blastocistos con expresión transgénica en comparación con blastocistos que poseen el plásmido pero no expresan el transgen. Futuras investigaciones se requieren para evaluar las causas de la fragmentación del ADN, comprender los mecanismos de transgenesis luego de la inyección de los complejos ADN exógeno-liposomas y especialmente determinar la eficiencia de integración del transgen utilizando esta técnica. En conclusión es necesario un balance justo entre la integración del transgen, su expresión, la preservación de la integridad del ADN y la extensión del cultivo para mejorar la eficiencia de nacimientos de animales transgénicos.

CAPITULO VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

6.1. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El primer objetivo de esta tesis fue estudiar el desarrollo in vitro de embriones bovinos reconstruidos por transferencia nuclear, empleando como donantes de núcleo genomas masculinos clonados. Nosotros hipotetizamos que mediante la producción de embriones androgenéticos bovinos, es posible replicar genomas haploides a partir de un único espermatozoide bovino y estas réplicas pueden ser utilizadas para reconstruir embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto. Los resultados obtenidos en el capítulo II demostraron que es posible replicar genomas espermáticos haploides a partir de un único espermatozoide bovino mediante la generación de embriones androgenéticos haploides. También pudimos observar que genomas masculinos obtenidos de embriones androgenéticos haploides hasta estadio de 16 células, mantienen su capacidad de generar embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto cuando cada uno de estos genomas es fusionado con ovocitos en estadio de MII.

A continuación nos propusimos como objetivo generar mediante la utilización de gametas bovinas clonadas, embriones biparentales transgénicos que expresen un gen exógeno en forma homogénea, reduciendo las tasas de mosaicismo y permitiendo multiplicar el número de animales transgénicos generados a partir de una sola gameta. Los embriones androgenéticos generados por FIV-SMGT con espermatozoides expuestos a un transgén desarrollaron hasta estadio de blastocisto, pero ninguno de ellos expresó el transgen. Sin embargo la aplicación de la ICSI-SMGT para la generación de embriones haploides

androgenéticos permitió obtener expresión transgénica en dichos embriones, independientemente de la presencia del genoma materno. Cuando la reconstrucción de embriones biparentales se realizó utilizando blastómeras haploides androgenéticas con expresión transgénica, se obtuvieron embriones que expresaron un transgen, y en su mayoría en forma homogénea.

Por otra parte, la generación de gametas clonadas permitió determinar el sexo de los núcleos espermáticos replicados antes de ser utilizados en la reconstrucción de embriones, constituyendo una nueva y ventajosa forma de generar crías de sexo predeterminado.

Otro de los objetivos planteados fue desarrollar un nuevo método de transgénesis por FIV que aumente la eficiencia de producción de embriones transgénicos en la especie bovina, con el objetivo de simplificar la producción de animales genéticamente modificados. En este caso nuestra hipótesis fue que la inyección de complejos ADN exógeno-liposomas directamente en el citoplasma de ovocitos y cigotos, permite generar embriones de FIV y de activación partenogenética que expresen un transgén. Los experimentos realizados en el capítulo III demostraron que es posible transfectar cigotos bovinos de FIV de manera eficiente y rápida mediante la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas, sin reducir la viabilidad de los embriones generados. También se demostró que la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas permite generar embriones partenogenéticos diploides que expresan un transgen, y que esta expresión es independiente de la presencia de un pronúcleo masculino.

En el capítulo IV estudiamos el desarrollo in vitro de embriones bovinos reconstruidos por transferencia nuclear, empleando como donantes de núcleo genomas femeninos clonados. Nuestra hipótesis de partida fue que mediante la producción de embriones partenogénéticos, es posible replicar genomas haploides a partir de un único ovocito bovino y estas réplicas pueden ser utilizadas para reconstruir embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto. A partir de los resultados obtenidos demostramos que genomas femeninos de embriones partenogénéticos haploides hasta estadio de 16 células, mantienen su capacidad de generar embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto cuando cada uno de estos genomas es fusionado con hemicigotos masculinos. También observamos que la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas permite generar embriones partenogénéticos haploides que expresen un transgen sin reducir la viabilidad de los embriones generados. El siguiente paso a seguir fue generar mediante la utilización de gametas bovinas clonadas, embriones biparentales transgénicos que expresen un gen exógeno en forma homogénea, reduciendo las tasas de mosaicismo. Cuando la reconstrucción de embriones biparentales se realizó utilizando blastómeras haploides partenogénéticas con expresión transgénica, se obtuvieron embriones que expresaron un transgen, y en su mayoría en forma homogénea.

Por último, en el capítulo V demostramos que es posible la utilización con éxito de diferentes construcciones genéticas para ser inyectadas en cigotos de FIV, sin efecto perjudicial sobre el desarrollo embrionario. Evaluamos también la incidencia de fragmentación del ADN tras la inyección del transgen, demostrando que su expresión afecta la integridad del ADN en blastocistos bovinos de FIV, pero no así las tasas de

desarrollo *in vitro*. Además pudimos observar que la duración del cultivo *in vitro* incide sobre el porcentaje de núcleos fragmentados en blastocistos bovinos de FIV.

A partir de lo expuesto anteriormente, la presente tesis conforma una base sólida para concluir que es posible la clonación de genomas de ovocitos y espermatozoides con capacidad de generar embriones biparentales que evolucionan hasta estadio de blastocisto. Además, este procedimiento demostró ser una herramienta eficiente para la incorporación de genes exógenos en un embrión, al igual que la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas, en embriones partenogenéticos y de FIV.

CONSIDERACIONES FUTURAS

Las posibilidades y aplicaciones que ofrece la investigación en el campo de las biotecnologías reproductivas de última generación son muy amplias. Día a día numerosos estudios son realizados sobre micromanipulación y modificación genética de gametas y embriones, abriendo nuevos caminos a la investigación.

- En la presente tesis hemos desarrollado diferentes técnicas para producir embriones androgenéticos, los cuales podrían ser utilizados en futuras investigaciones para generar líneas estables de células haploides androgenéticas de origen embrionario como una fuente alternativa de gametas masculinas. Esto podría generar un número ilimitado de embriones biparentales mediante la combinación de estas células haploides con ovocitos maduros, creando así una nueva forma de combinar características genéticas de ambos progenitores en forma similar a una fertilización normal.

- En nuestros experimentos hemos demostrado que es posible la expresión de un transgén en diversos tipos de embriones, utilizando diferentes técnicas. Sin embargo, un aspecto muy importante a determinar es la eficiencia de integración y el número de inserciones del ADN exógeno en dichos embriones.
- De igual forma, es de gran importancia determinar el mecanismo de transgénesis involucrado al utilizar la inyección intracitoplasmática de complejos ADN exógeno-liposomas.
- Utilizando esta técnica, realizamos transferencias embrionarias para determinar la eficiencia de integración y sobrevida utilizando del proceso, pero un mayor número es requerido para aumentar las probabilidades de obtener animales nacidos que hayan incorporado el transgen.
- En cuanto a la clonación del genoma del ovocito, sería de gran interés la evaluación de la tasa de sobrevida tras la criopreservación de embriones partenogénéticos haploides bovinos y su posterior capacidad de reconstruir embriones biparentales. En el futuro, la criopreservación de embriones haploides partenogénéticos podría ser una opción para el establecimiento de bancos genéticos para la conservación de la biodiversidad.
- Al igual que con los embriones androgenéticos, sería de interés considerar la generación de líneas estables de células haploides partenogénicas de origen embrionario como una fuente alternativa de gametas femeninas. Esto podría generar un número ilimitado de embriones biparentales mediante la combinación de estas células haploides femeninas con hemicingotos masculinos haploides.

REFERENCIAS

1. Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69: 72–80.
2. Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J., Wolf, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Development Biology*, 45: 797-809.
3. Alderson, J., Wilson, B., Laible, G., Pfeffer, P., L'Huillier, P. 2006. Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. *Anim Reprod Sci*, 91: 23-30.
4. Aleksic, I., Ren, M., Popov, A., Freimark, D., Blanche, C., Czer, L., Trento, A., Barath, P. 1997. In vivo liposomemediated transfection of HLA-DR alpha-chain gene into pig hearts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 12: 792-797.
5. Alikani, M., Calderon, G., Tomkin, G., Garrisi, J., Kokot, M., Cohen, J. 2000. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum Reprod*, 15: 2634-2643.
6. Bachiller, D., Schellander, K., Peli, J., R  ther, U. 1991. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev*, 30: 194-200.
7. Barra, J., Renard, J. P. 1988. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell 484 stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development*, 102: 773-779.
8. Barton, S. C., Surani, M. A., Norris, M. L. 1984. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 311: 374–376.
9. Bavister, B. D., Yanagimachi, R. 1977. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Biol Reprod*, 16: 228–237.
10. Bedford, J. M. 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod*, 33: 698–704.
11. Benhamou, P. Y., Moriscot, C., Prevost, P., Rolland, E., Halimi, S., Chroboczek, J. 1997. Standardization of procedure for efficient ex vivo gene transfer into porcine pancreatic islets with cationic liposomes. *Transplantation*, 63: 1798-1803.
12. Betts, D. H., King, W. A. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, 55: 171-191.

13. Bhak, J. S., Lee, S. L., Ock, S. A., Kumar, M. B., Choe, S. Y., Rho, G. J. 2006. Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. *Anim Reprod Sci*, 92: 37–49.
14. Boediono, A., Suzuki, T., Li, L. Y., Godke, R. A. 1999. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 53: 159-170.
15. Bondioli, K., Ramsoondar, J., Williams, B., Costa, C., Fodor, W. 2001. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol Reprod Dev*, 60:189-195.
16. Booth, P. J., Holm, P., Vajta, G., Greve, T., Callesen, H. 2001. Effect of two activation treatments and age of blastomere karyoplasts on in vitro development of bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 60: 377-83.
17. Brackett, B. G., Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa. *Biol Reprod*. 12: 260-74.
18. Brackett, B. G., Baranska, W., Sawicki, W., Koprowski, H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 352-357.
19. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boic, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., Dressel, M. A. 1982. Normal development following fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 27: 147-158.
20. Bradbury, M. W., Isola, L. M., Gordon, J. W. 1990. Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 4053–4057.
21. Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., Palmiter, R. D. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 4438-4442.
22. Brinster, R. L., Sandgren, E. P., Behringer, R. R., Palmiter, R. D. 1989. No simple solution for making transgenic mice. *Cell*, 59: 239-241.
23. Brun, B. 1974. Studies on fertilization in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod*, 11:513-518.
24. Camper, S. A., Saunders, T. L., Kendall, S. K., Keri, R. A., Seasholtz, A. F., Gordon, D. F., Birkmeier, T. S., Keegan, C. E., Karolyi, I. J., Roller, M. L., Burrows, H. L., Samuelson, L. C. 1995. Implementing transgenic and embryonic stem cell technology to study gene expression, cell-cell interactions and gene function. *Biol Reprod*, 52: 246-257.

25. Carballada, R., Degefa, T., Esponda, P. 2000. Transfection of mouse eggs and embryos using DNA combined to cationic liposomes. *Mol Reprod Dev*, 56: 360-365.
26. Carballada, R., Relloso, M., Esponda, P., 2002: Generation of transgenic mice by transfection of pronuclear embryos using lipid-DNA complexes. *Zygote*, 10, 209-16.
27. Catt, J. W., Rhodes, S. L. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev*, 7:161-166.
28. Catt, J. W. 1996. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. *Anim Reprod Science*, 42: 239-250.
29. Celebi, C., Auvray, P., Benvegna, T., Plusquellec, D., Jegou, B., Guillaudeux, T. 2002. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev*, 62: 477-482.
30. Chan, A. W. S., Homan, J. E., Ballou, L. U., Burns, J. C., Bremel, R. D. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Agricultural Sciences*, 95: 14028-14033.
31. Chan, A. W., Kukulj, G., Skalka, A. M., Bremel, R. D. 1999. Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol Reprod Dev*, 52: 406-413.
32. Chan, A. W., Luetjens, C. M., Dominko, T., Ramalho-Santos, J., Simerly, C. R., Hewitson, L., Schatten, G. 2000. 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*, 6: 26-33.
33. Chauhan, M. S., Nadir, S., Bailey, T. L., Pryor, A. W., Butler, S. P., Notter, D. R., Velandar, W. H., Gwazdauskas, F. C. 1999. Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *J Dairy Sci*, 82: 918-926.
34. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P.J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F. A., Robl, J. M. 1998a. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, 16: 642-646.
35. Cibelli, J., Stice, S. L., Gluekey, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, A., Robl, J. M. 1998b. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, 280: 1256–1258.
36. Clarke, A. R. 1994. Murine genetic models of human disease. *Curr Opin Genet Dev*, 4: 453-460.

37. Coleman, D. A., Dailey, R. A., Leffel, R. E., Baker, R. D. 1986. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J dairy Sci*, 70: 858-866.
38. Collas, P., Fissore, R., Robl, J. M., Sullivan, E. J., Barnes, F. L. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 34: 212–223.
39. Colley, A., Buhr, M., Golovan, S. P. 2008. Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology*, 70: 978–983.
40. Cruz, N. T. D., Wilson, K. J., Cooney, M. A., Tecirlioglu, R. T., Lagutina, I., Galli, C., Holland, M. K., French, A. J. 2008. Putative imprinted gene expression in uniparental bovine embryo models. *Reprod Fertil Dev*, 20: 589–597.
41. Dauzier, L., Thibault, C., Wintenberger, S. 1954. La fecondation in vitro de l'oeuf de lapine *Comptes Rendus de l'Academie de Science*, 238: 844–845
42. Debec, A. 1984. Evolution of karyotype in haploid cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res*, 151: 236–246.
43. De La Fuente, R., King, W. A. 1998. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod*, 58: 952-962.
44. Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals *Reproduction*, 122: 829–838.
45. Erickson, B. H. 1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 10: 97–105.
46. Escribá, M. J., García-Ximénez, F. 2001. Reconstruction of the heteroparental diploid condition in rabbit zygotes by nuclear transfer. *Theriogenology*, 55: 771–784.
47. Escribá, M. J., García-Ximénez, F. 1999. Electroactivation of rabbit oocytes in an hypotonic pulsing medium and parthenogenetic development without cytochalasin B-diplmdizing pre-treatment. *Theriogenology*, 51: 963-973.
48. Escribá, M. J., García-Ximénez, F. 2000. Influence of sequence duration and number of electrical pulses upon rabbit oocyte activation and parthenogenetic development. *Anim Reprod Sci*, 59: 99-107.
49. Eyestone, W. H. 1999. Production and breeding of transgenic cattle using embryo production technology. *Theriogenology*, 51: 509-517.
50. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient,

- lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7413-7417.
51. Fiona, H., Thomas, B., Vanderhyden, C. 2006. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4:19.
 52. Freed, J. J., Mezger-Freed, L. 1970. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 65: 337-344.
 53. Fissore, R. A., Dobrinsky, J. R., Balise, J. J., Duby, R. T., Robl, J. 1992. Patterns of intracellular Ca²⁺ concentrations in fertilised bovine eggs. *Biol. Reprod*, 47: 960-969.
 54. Gagné, M. B., Pothier, F., Sirard, M. A. 1991. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev*, 29: 6-15.
 55. Gandolfi, F., Terqui, M., Modina, S., Brevini, T. A., Ajmone-Marsan, P., Foulon-Gauze, F., Courot, M. 1996. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. *Reprod Fertil Dev*, 8: 1055–1060.
 56. García-Ximénez, F., Escribá, M. J. 2002. Viable offspring derived from cryopreserved haploid rabbit parthenotes. *Theriogenology*, 57:1319–1325.
 57. Gibson, C., Golub, E., Herold, R., Risser, M., Ding, W., Shimokawa, H., Young, M., Termine, J., Rosenbloom, J. 1991. Structure and expression of the bovine amelogenin gene. *Biochemistry*, 30: 1075–1079.
 58. Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., Plante, C., Pollard, J. W., Fan, M. Z., Hayes, M. A., Laursen, J., Hjorth, J. P., Hacker, R. R., Phillips, J. P., Forsberg, C. W. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol*, 19: 741-745.
 59. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., Ruddle, F. H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 77: 7380-7384.
 60. Gordon, J. W., Ruddle, F. H. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214:1244-1246.
 61. Gordon, J. W. 1989. Transgenic animals. *Int Rev Cytol*, 115: 171-229.
 62. Goto, K., Kinoshita, Takuma, Ogawa, K. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Rec*, 127:517-520.

63. Grondahl, C., Hansen, T. H., Hossaini, A., Heinze, I., Greve, T., Hyttel, P. 1997. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro-matured equine oocytes. *Biol Reprod*, 57:1495-1501.
64. Hagemann, L. J., First, N. L. 1992. Embryonic cytoplasmic extracts rescue murine androgenomes to the blastocyst stage. *Development*, 114: 997–1001.
65. Halet, G., Tunwell, R., Parkinson, S. J., Carroll, J. 2004. Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca²⁺ oscillations at fertilization in mouse eggs. *J Cell Biol*, 164:1033-44.
66. Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E. Jr, Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315: 20-26.
67. Hardy, K. Cell death in the mammalian blastocyst. 1997. *Mol Hum Reprod*, 3: 919-925.
68. Henery, C. C., Kaufman, M. H. 1992. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Mol Reprod Dev*, 31:258-263.
69. Hiramoto, Y. 1962. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res*, 27:416-426.
70. Hoelker, M., Mekchay, S., Schneider, H., Bracket, B. G., Tesfaye, D., Jennen, D., Tholen, E., Gilles, M., Rings, F., Griese, J., Schellander, K. 2007. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: Effect of transfection reagent and DNA architecture. *Theriogenology*, 67: 1097-1107.
71. Hofker, M. H., Breuer, M. 1998. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol*, 110: 63-78.
72. Holm, P., Booth, P., Schmidt, M., Greve, T., Callesen, H. 1999. High bovine blastocyst development in a static production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52: 683-700.
73. Horan, R., Powell, R., Bird, J. M., Gannon, F., Houghton, J. A. 1992. Effects of electropermeabilization on the association of foreign DNA with pig sperm. *Arch Androl*, 28: 105-114.
74. Houdebine, L. M. 2005. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim*, 40:269-281.

75. Hutchins, J. R., Dikovskaya, D., Clarke, P. R. 2003. Regulation of Cdc2/cyclin B activation in *Xenopus* egg extracts via inhibitory phosphorylation of Cdc25C phosphatase by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Biol Cell*, 14: 4003-4014.
76. Hyun, S., Lee, G., Kim, D., Kim, H., Lee, S., Nam, D., Jeong, Y., Kim, S., Yeom, S., Kang, S., Han, J., Lee, B., Hwang, W. 2003. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod*, 69: 1060-1068.
77. Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y., Okabe, M. A. 1995. Rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Letters*. 375:125-128.
78. Jaenisch, R. 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Cell Biology*, 73: 1260-1264.
79. Jamnongjit, M., Hammes, S. R. 2005. Oocyte Maturation: The Coming of Age of a Germ Cell. *Semin Reprod Med*, 23: 234-241.
80. Jang, G., Bhuiyan, M. M., Jeon, H. Y., Ko, K. H., Park, H. J., Kim, M. K., Kim, J. J., Kang, S. K., Lee, B. C., Hwang, W. S. 2005. An approach for producing transgenic cloned cows by nuclear transfer of cells transfected with human alpha 1-antitrypsin gene. *Theriogenology*, 65:1800-1812.
81. Kaneko, T., Moisyadi, S., Sukanuma, R., Hohn, B., Yanagimachi, R., Pelczar, P. 2005. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 64: 1704–1715.
82. Kaneko-Ishino, T., Kohda, T., Ishino, F. 2003. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. *J Biochem*, 133: 699–711.
83. Kaufman, M. H., Gardner, R. L. 1974. Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following activation and embryo transfer. *J Embryol Exp Morphol*, 31: 635-42.
84. Kaufman, M. H. 1983. *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press, 84-164.
85. Kaufman, M. N., Lee, K. K. H., Speirs S. 1989. Post-implantation development and cytogenetic analysis of diandric heterozygous diploid mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet*, 52: 15-18.
86. Keefer, C. L. 2004. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci*, 82-83:5-12.

87. Kirchhof, N., Carnwath, J. W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H., Niemann, H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod*, 63:1698-1705.
88. Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., Van der Schans, A., Van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using " embryo production. *Biotechnology*, 9: 844-847.
89. Kubiak, J. Z., Weber, M., De Pennart, H., Winnston, N. J., Maro, B. 1993. The metaphase arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J*, 12: 3773-3778.
90. Kubisch, H. M., Hernandez-Ledezma, J. J., Larson, M. A., Sikes, J. D., Roberts, R. M. 1995. Expression of two transgenes in matured and fertilized bovine zygotes after DNA microinjection. *J Reprod Fertil*, 104: 133-139.
91. Kubisch, H. M., Larson, M. A., Funahashi, H., Day, B. N., Roberts, R. M. 1995. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF-derived porcine embryos. *Theriogenology*, 44: 391-401.
92. Kues, W. A., Niemann, H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol*, 22: 286-294.
93. Kuznyetsov, V., Kuznyetsova, I., Chmura, M., Verlinsky, Y. 2007. Duplication of the sperm genome by human androgenetic embryo production: towards testing the paternal genome prior to fertilization. *Reprod Biomed Online*, 14: 504-514.
94. Lacham-Kaplan, O., Trounson, A. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum Reprod*, 10: 2642-2649.
95. Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Galli, C. 2004. Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: A comparative study. *Biol Reprod*, 70: 400-405.
96. Latham, K. E., Akutsu, H., Patel, B., Yanagimachi, R. 2002. Comparison of Gene Expression During Preimplantation Development Between Diploid and Haploid Mouse Embryos. *Biol Reprod*, 67: 386-392.
97. Latham, K. E., Solter, D. 1991. Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos. *Development*, 113: 561-568.
98. Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., Spadafora, C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57: 717-723.

99. Ledley. 1995. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther*, 6: 1129-1144.
100. Lee, J. W., Dinnyes, A., Yang, X. 2003. Development of transgenic embryos following injection of freeze-fried sperm in pigs. *Theriogenology*, 59:305.
101. Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H., Sun, Y., Qing, Y. 2007. Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*, 21: 2037–2055.
102. Lindner, G. M., Wright, R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416.
103. Liu, L., Ju, J. C., Yang, X. 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev*, 49: 298-307.
104. Liu, L., Yang, X. 1999. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod*, 61: 1-7.
105. Liu, C. T., Chen, C. H., Cheng, S. P., Ju, J. C. 2002. Parthenogenesis of rabbit oocytes activated by different stimuli. *Anim Reprod Sci*, 70: 267–276.
106. Liu, L., Yang, X. 1999. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod*, 61: 1-7.
107. Loi, P., Ledda, S., Fulka, J., Cappai, P., Moor, R. M. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod*, 58:1177–1187.
108. Mateusen, B., Van Soom, A., Maes, D. G., Donnay, I., Duchateau, L., Lequarre, A. S. 2005. Porcine embryo development and fragmentation and their relation to apoptotic markers: a cinematographic and confocal laser scanning microscopic study. *Reproduction*, 129: 443-452.
109. Matsukawa, K., Turco, M. Y., Scapolo, P. A., Reynolds, L., Ptak, G., Loi, P. 2007. Development of sheep androgenetic embryos is boosted following transfer of male pronuclei into androgenetic hemizygotes. *Cloning Stem Cells*, 9: 374-381.
110. Matwee, C., Betts, D. H., King, W. A. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 8:57-68.
111. MacGrath, J., Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Scienc*, 220:1300-1303.

112. McGrath, J., Solter, D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37: 179–183.
113. Machaty, Z., Wang, W. H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biol Reprod*, 57:1123–7.
114. Madgwick, S., Jones, K. T. 2007. “How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor”. *Cell Division*, 26: 2-4.
115. Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130: 791–799.
116. Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., y col. 1997. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem*. 243: 527-536.
117. Méo, S. C., Yamazaki, W., Ferreira, C. R., Perecin, F., Saraiva, N. Z., Leal, C. L., Garcia, J. M. 2007. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. *Zygote*, 15:295–306.
118. Miki, H., Hirose, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Kezuka, F., Honda, A., Mekada, K., Hanaki, K. I., Iwafune, H., Yoshiki, A., y col., 2009. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. *Genesis*, 47: 155–160.
119. Miyazaki, S. I., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., Mikoshiba, K. 1992. Block ok Ca⁺² wavw and Ca⁺² oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-triphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, 257: 251-255.
120. Moreira, P. N., Giraldo, P., Cozar, P., Pozueta, J., Jimenez, A., Montoliu, L., Gutierrez-Adan, A. 2004. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, 71: 1943-1947.
121. Motlik, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. 1998. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 49: 461-9.
122. Moos, J., Visconti, P. E., Moore, G. D., Schultz, R. M., Kopf, G. S. 1995. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biology and Reproduction*, 53: 692-699.
123. Moses, R. M., Masui, Y. 1995. Metaphase arrest in newly matured or microtubule-depleted mouse eggs after calcium stimulation. *Zygote* 3: 1-8.

124. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*, 270: 86-90
125. Murakami, M., Fahrudin, M., Varisanga, M., Suzuki, T. 1999. Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. *J Vet Med Sci*, 61: 843–847.
126. Murray, A., Hunt, T. 1993. *The Cell Cycle*. Oxford University Press, 251.
127. Naruse, K., Ishikawa, H., Kawano, H. O., Ueda, H., Kurome, M., Miyazaki, K., Endo, M., Sawasaki, T., Nagashima, H., Makuuchi, M. 2005. Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev*, 51: 539-546.
128. Niemann, H., Lampeter, W. W., Sacher, B., Kruff, B. 1982. Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing. *Theriogenology*, 18: 445-452.
129. Noble, M. E. M., Endicott, J. A., Johnson, L. N. 2004. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, 13: 2751-2765
130. Nottle, M. B., Haskard, K. A., Verma, P. J., Du, Z. T., Grupen, C. G., McIlfatrick, S. M., Ashman, R. J., Harrison, S. J., Barlow, H., Wigley, P. L., Lyons, I. G., Cowan, P. J., Crawford, R. J., Tolstoshev, P. L., Pearse, M. J., Robins, A. J., d'Apice, A. J. 2001. Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. *Transgenic Res*, 10: 523-531
131. Obata, Y., Ono, Y., Akuzawa, H., Kwon, O. Y., Yoshizawa, M., Kono, T. 2000. Post-implantation development of mouse androgenetic embryos produced by in vitro fertilization of enucleated oocytes. *Human Reprod*, 15: 874-880.
132. Paffoni, A., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., Ragni, G. 2008. Parthenogenetic Activation: Biology and Applications in the ART Laboratory. *Placenta*, 29: 121–125.
133. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A. C. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340: 17–18.
134. Park, C. H., Kim, H. S., Lee, S. G., Lee, C. K. 2009. Methylation status of differentially methylated regions at Igf2/H19 locus in porcine gametes and preimplantation Embryos. *Genomics*, 93: 179–186.
135. Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martín, R., Olivera, R., Jarazo, J., Vichera, G., Gibbons, A., Salamone, D. 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reprod Fertil Dev*, 20: 741-749.

136. Perry, A. C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284: 1180-1183.
137. Presicce, G. A., Yang, X. 1994. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and Cycloheximide. *Mol.Reprod.Dev*, 38: 380-385.
138. Probst, S., Rath, D. 2003. Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology*, 59: 961-973.
139. Pope, C. E., Johnson, C. A., Mcrae, M. A., Keller, G. I., Dresser, B.I. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci*, 53: 221-236.
140. Pursel, V. G., Rexroad, C. E. Jr. 1993a. Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep. *Mol Reprod Dev*, 36: 251-254.
141. Pursel, V. G., 1993b. Rexroad CE Jr. Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci*, 71: 10-19.
142. Ramalho, M. F., Garcia, J. M., Esper, C. R., Vantini, R., Alves, B. C., Almeida-Junior, I. L., Hossepian de Lima, V. F., Moreira-Filho, C. A. 2004. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer H-Y antisera. *Theriogenology*, 62: 1569–1576.
143. Rieth, A., Pothier, F., Sirard, M. A. 2000. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Mol Reprod Dev*, 57: 338-345.
144. Revazova, E. S., Turovets, N. A., Kochetkova, O. D., Kindarova, L. B., Kuzmichev, L. N., Janus, J. D., Pryzhkova, M. V. 2007. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells*, 9:432-449.
145. Rho, G. J., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, S. P., Betteridge, K. J. 1998. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev*, 50:485-492.
146. Rideout, W. M., Eggan, K., Jaenisch, R. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 293:1093-1098.
147. Reiss, M., Jastreboff, M. M., Bertino, J. R., Narayanan, R. 1986. DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation. *Biochem Biophys Res Commun*, 137: 244-249.

148. Salamone, D., Barañao, L., Santos, C., Bussmann, L., Artuso, J., Werning, C., Prync, A., Carbonetto, C., Dabsys, S., Munar, C., y col., 2006. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol*, 124: 469–472.
149. SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. 1989. Version 6.4th Edn. SAS Institute Inc Cary NC. 1: 943.
150. Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M. et al. 2002. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129: 3533–3544.
151. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., Campbell, K. H. S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278: 2130-2133.
152. Shim, S. W., Kim, Y. H., Jun, S. H., Lim, J. M., Chung, H. M. 2000. Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53:521.
153. Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. L., Barnes, F. L., Sims, M. L., First, N. L. 1989. Timing of Nuclear Progression and Protein Synthesis Necessary for Meiotic Maturation of Bovine Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 40: 1257-1263.
154. Szöllösi, M., Cúbica, J., Debey, P., Pennard, H., Szöllösi, D., Maro, B. 1993. Inhibition of protein Kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J.Cell.Sci*, 104: 861-872.
155. Smith, K., Spadafora, C. 2005. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays*, 27: 551-562.
156. Smitz, J., Cortvrindt, R. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*, 123: 185–202.
157. Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M. L., Forni, M., Maione, B., Spadafora, C., Lavitrano, M. 1996. Sperm mediated gene transfer in bovine and swine species. *Anim Biotech*, 7: 59-77.
158. Stice, S. L., Robl, J. M., Ponce de Leon, F. A., Jerry, J., Golueke, P. G., Cibelli, J. B., Kane, J. J. 1998. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 49: 129-138.
159. Straubinger, R. M., Hong, K., Friend, D. S., Papahadjopoulos, D. 1983. Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell*, 32: 1069-1079.

160. Surani, M. A. H., Barton, S. C., Norris, M. L. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature Lond*, 308: 548-550.
161. Surani, M. A. H., Barton, S. C., Norris, M. L. 1986. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*, 45: 127–136.
162. Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L., Schutzkus, V., First, N. L. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol*, 166:729–739.
163. Szczygiel, M. A., Moisyadi, S., Ward, W. S. 2003. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection mediated transgenesis in the mouse. *Biol Reprod*, 68: 1903–1910.
164. Szöllösi, M., Kubiak, J., Debey, P., De Pennard, H., Szöllösi, D., Maro, B. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci*, 104: 861-872.
165. Tervit, H. R., Whittingham, D. G., Rowson, L. E., 1972: Successful culture of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30, 493-497.
166. Thibault, C., Dauzier, L., Wintenberger, S. 1954. Etude cytologique de la fecondation in vitro de l'oeuf de la lapine *Comptes Rendue de la Societe de Biologie*, 148: 789–790
167. Uehara, T., Yanahimachi, R. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod*, 15: 467-470.
168. Vajta, G., Peura, T. T., Holm, P., Paldi, A., Greve, T., Trouson, A. O., Callesen, H. (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod dev*. 55, 256-264.
169. Varmus, H. 1998. Retroviruses. *Science*, 240: 1427-1435.
170. Van De Velde, A., Liu, L., Bols, P. E., Ysebaert, M. T., Yang, X. 1999. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 54: 57–62.
171. Van Reenen, C. G., Meuwissen, T. H. E., Hopster, H., Oldenbrock, K., Kruijthuis, A. M., Blokhuis, H. J. 2001. Transgenesis may affect farm animal welfare: A case for systematic risk assessment. *J Anim Sci*, 79: 1763-1779.

172. Vichera, G., Alfonso, J., Duque, C. C., Silvestre, M. A., Pereyra-Bonnet, F., Fernandez-Martin, R., Salamone, D. 2009. Chemical activation with a combination of ionomycin and dehydroleucodine for production of parthenogenetic, ICSI and cloned bovine embryos. *Reprod Dom Anim*, 45: e306–e312.
173. Vichera, G., Moro, L., Salamone, D. 2010. Efficient transgene expression in IVF and parthenogenetic bovine embryos by intracytoplasmic injection of DNA-liposome complexes. *Reprod Dom Anim*, 46: 214-20.
174. Vrana, K. E., Hipp, J. D., Goss, A. M., McCool, B. A., Riddle, D. R., Walker, S. J., Wettstein, P. J., Studer, L. P., Tabar, V., Cunniff, K., Chapman, K., Vilner, L., West, M. D., Grant, K. A., Cibelli, J. B. 2003. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 11911-11916.
175. Wagner, E. F., Covarrubias, L., Stewart, T. A., Mintz, B. 1983. Prenatal lethalties in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line. *Cell*, 35:647-655.
176. Wall, R. J. 1996. Transgenic Livestock: Progress and Prospects for the Future. *Theriogenology*, 45: 57-68.
177. Wall, R. J. 2001. Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells*, 3: 209-220.
178. Wall, R. J. New gene transfer methods. *Theriogenology* 2002; 57:189-201.
179. Wells, D. N., Misica, P. M., Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 60: 996–1005.
180. Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J. G., Armstrong, D. G. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influence. *Journal of Animal Science*, 82: 63-74.
181. Wight, Wagner.1994. Transgenic mice: a decade of progress in technology and research. *Mutat Res*, 307: 429-40.
182. Wilmut, I., Archibald, A. L., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J. P., Whitelaw, C. B., Clark, A. J. 1990. Modification of milk composition. *J Reprod Fertil Suppl*, 41: 135-146.
183. Williams, C. J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update*, 8:313-321.
184. Xu, K. P., Greve, T. 1988. A detailed analysis of early events during fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fertil*, 82: 127–134.

185. Yamauchi, Y., Doe, B., Ajduk, A., Ward, M. A. 2007. Genomic DNA damage in mouse transgenesis. *Biol Reprod*, 77: 803–812.
186. Yanagimachi, R. 2005. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reprod Biomed Online*, 10: 247- 288.
187. Yi, Y. J., Park, C. S. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci*, 86: 297–304.
188. Yi, M., Hong, N., Hong, Y. 2009. Generation of Medaka Fish Haploid Embryonic Stem Cells. *Science*, 326: 430-433.
189. Yoo, J. G., Choe, S. Y., Rho, G. J. 2003. Efficient production of cloned bovine embryos using cdc2 kinase inhibitor. *Reprod Domest Anim*, 38: 444-450.