

EXPRESIÓN PLASMÍDICA HETERÓLOGA EN EMBRIONES OVINOS OBTENIDOS POR FIV USANDO EL ESPERMATOZOIDE COMO VECTOR

Investigadores USAL:

Director Diaz Pumara, Patricio Zenón (patricio.pumara@usal.edu.ar);

Rafaelli, Paula Mariana; Rosales, Juan; Núñez, María Mercedes.

Resumen

La obtención de “animales genéticamente modificados” (AGM) tiene gran importancia a nivel nacional e internacional. Existen centenares de AGM, mayormente de laboratorio, utilizados como “modelo animal” para estudiar enfermedades humanas de difícil resolución como obesidad, Alzheimer, diabetes, cáncer, artritis o Parkinson (Smolenski et al. & Wilmut et al., 2007). En animales de granja los resultados están lejos de las expectativas científicas de dos décadas atrás por los bajos rendimientos y altos costos de los métodos utilizados para modificar el genoma animal (Rifkin et al., 1998 & Wilmut et al., 2007) La técnica de “Transferencia de Genes Mediada por Espermatozoides” (“Sperm Mediated Gene Transfer”) es vista como la alternativa más eficiente y económica si bien no se encuentra del todo establecida para muchas especies (Lavitrano et al., 1999; Lavitrano et al. 1996 & Pereyra-Bon 2011).

Nuestro objetivo es demostrar que es posible la obtención de embriones ovinos genéticamente modificados mediante combinación de las técnicas de Fertilización In-Vitro (FIV) y Transferencia de Genes por Medio de Espermatozoides (SMGT) (Díaz Pumará et al., 2010; Rafaelli, et al., 2011; Pereyra-Bonnet et al., 2011 & Webster et al., 2005). Utilizaremos como transgen el plásmido comercial pEGFP-N1 (GenBank Accession #U55762 Clontech USA) integrado al espermatozoide. Esta construcción plasmídica comercial presenta, precedida por el “casette” de iniciación Kozak, que le permite codificar eficientemente en células eucariotas, una zona de múltiple clonado (MCS) bajo el promotor del Citomegalovirus (CMV) humano a la que sigue un área que codifica genes para la producción de una señal fluorescente (GFP). Su utilización nos permitirá evaluar el resultado del método aplicado, observando los embriones producidos con Microscopia Confocal de Fluorescencia (Díaz Pumará et al., 2010; Rafaelli, et al., 2011; Pereyra-Bonnet et al., 2011 & Webster et al., 2005).

Más adelante nos proponemos lograr fetos y animales nacidos viables, genéticamente modificados con dos estrategias. En primer lugar la siembra de embriones transgénicos obtenidos por FIV y SMGT, luego la aplicación de inseminación artificial de hembras sincronizadas con semen co-incubado previamente con la construcción génica. La evaluación de estas dos estrategias se hará con controles de expresión de genes en las diferentes etapas del desarrollo 1) embrionario 2) fetal y 3) adulto utilizando los métodos disponibles, Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, Hibridación Fluorescente In-Situ (FISH) y Western Blot (Lavitrano et al, 1999; Smolenski et al. 2007 & Webster et al., 2005).

Palabras clave: Modificación genética; fertilización in Vitro (FIV); organismos genéticamente modificados (OGM).

Abstract

Obtaining Genetically Modified Animals (GMA) is of great importance, both at national and international levels. There exist hundreds of GMA, mostly laboratory animals used as “animal sample” for doing research on diseases affecting humans that are particularly difficult to cure, such as obesity, Alzheimer, diabetes, cancer, arthritis, Parkinson’s and others (Smolenski et al. & Wilmut et al., 2007). Nevertheless, in farm animals results are far from the scientific expectations of two decades ago. This fact is explained by the low performance and high costs of the usual methods that are being used to modify the animal genome (Rifkin et al., 1998 & Wilmut et al., 2007). The technique called “Sperm Mediated Gene Transfer” (SMGT) is considered as the most efficient and economical alternative nowadays, although it has not been entirely established for many species (Lavitrano et al, 1999; Lavitrano et al. 1996 & Pereyra-Bon 2011).

Our goal is demonstrating that it is possible to obtain genetically modified ovine embryos by combining the techniques of in-vitro fertilization (IVF) and Sperm mediated Gene Transfer (SMGT) (Díaz Pumará et al., 2010; Rafaelli, et al., 2011; Pereyra-Bonnet et al., 2011 & Webster et al., 2005). Commercial plasmid pEGFP-N1 (Clontech #U55762 USA) integrated into sperm. will be used for this purpose. This construct preceded by the initiation cassette “Kozak” that allows a multiple cloning region (MCS) in eukariotic cells under human cytomegalovirus (CMV) promoter is followed by an area encoding a fluorescent signal. Therefore we will evaluate results observing produced embryos under confocal fluorescence microscopy (Díaz Pumará et al., 2010; Rafaelli, et al., 2011; Pereyra-Bonnet et al., 2011 & Webster et al., 2005).

Later we will try to produce fetuses and viable live animals, genetically modified by using two strategies: transferring transgenic embryos obtained by IVF and SMGT and Artificial Insemination (AI) over previously synchronized females using co-incubated sperm with the heterologous gene construct. The assessment of these two strategies will be carried out through gene expression controls in the different stages of development : embryos, fetuses and adults applying the available methods , such as Polymerasa Chain Reaction (PCR), Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH) and Western Blotting (Lavitrano et al, 1999; Smolenski et al. 2007 & Webster et al., 2005).

Keywords: Genetic alteration; in vitro fertilization (IVF); genetically modified organisms (GMO).