

EXPRESIÓN PLASMÍDICA HETERÓLOGA EN EMBRIONES OVINOS OBTENIDOS POR FERTILIZACIÓN *IN VITRO* USANDO EL ESPERMATOZOIDE COMO VECTOR

Investigadores USAL:

Director Díaz Pumará, Patricio (patricio.pumara@usal.edu.ar); Rafaelli, Paula; Nuñez, Mercedes

Investigadores externos:

Iorio, Gabriel; Vazquez-Levin, Mónica

Personal de Apoyo:

Rosales, Juan

Alumnos practicantes USAL:

Menarini, Mercedes; Obligado, Carlos; Brutti, Martín; Aguerre, Julia

Resumen

Los resultados en la obtención de animales de granja genéticamente modificados (AGGM), no están aún a la altura de las expectativas científicas. A nivel mundial, los AGGM patentados y funcionales son muy escasos. Esta lentitud en resultados medido en términos de AGGM nacidos, reproductivamente viables por ensayo, es asignada al bajo rendimiento de las técnicas utilizadas, su costo elevado y el riesgo asociado a la bioseguridad.

La hipótesis de trabajo fue que el espermatozoide fértil e intacto, de vertebrados mamíferos superiores, es capaz de portar ADN heterólogo y durante el acto de la fecundación, sea *in-vitro* o *in-vivo*, integrarlo funcionalmente al genoma del cigoto. Consecuentemente, será posible su expresión en los blastómeros del embrión y las células diferenciadas del organismo adulto. Asimismo, se postuló que los resultados medidos en términos de tasa de ensayo/éxito de esta técnica superan ampliamente a las otras técnicas utilizadas.

Se lograron generar embriones ovinos por fecundación *in-vitro* (FIV) de acuerdo a los parámetros del tratamiento del espermatozoide (SPZ) previamente establecidos. Para lograr este objetivo se utilizaron 48 complejos *cumulus ovocito* (CCOs) provenientes de 35 tractos genitales ovinos de matadero, cultivados y madurados *in-vitro*. Dos muestras, una tratada con semen tratado y la otra (control) con semen no tratado, fueron puestas a fertilizar. Luego de la fertilización y cultivo los embriones fueron retirados y observados bajo microscopía microcaptura láser fluorescente (LCM) y confocal de fluorescencia. Si bien la muestra control debió ser descartada al momento de la observación por excesiva fibrinosis, en la muestra tratada pudieron observarse 11 blastocistos expandidos con intensa señal de fluorescencia en todas las blastómeros, 6 ovocitos no fertilizados y 4 embriones malformados que no presentaron señal bajo luz fluorescente.

Se consideró testigo a los ovocitos no fertilizados que no presentaron fluorescencia alguna; y se los estimó como evidencia válida para demostrar la transfección realizada por parte del SPZ. Solo

aquellos que fueron fecundados, y en este caso la totalidad (100%), evidenciaron fluorescencia en todas las blastómeros en las diferentes muestras.

Palabras clave: animales de granja genéticamente modificados (AGGM); fecundación *in-vitro* (FIV); espermatozoide (FIV); complejo *cúmulus ophorus* (FIV); transferencia de genes mediada por espermatozoides (SMGT).

Abstract

Production of genetically modified farm animals (GMFA) is not yet up to scientific expectations. This slowness results measured in terms of GMFA born, reproductively viable (“founders”) by trial, is assigned to the very low yield of the techniques used to incorporate gene constructs, therefore, high cost and bio-security risk of some of them.

Our hypothesis, was that properly treated, fertile and intact mammalian sperm is capable of carrying heterologous DNA, and, during the act of fecundation, either *in-vitro* or *in-vivo*, functionally integrate it into the resulting zygote genome, allowing subsequent expression in embryo blastomeres and differentiated cells of the adult organism, and, that the results measured as test rate / success of this technique, far outweigh other techniques used with the same objective.

As specific goals we proposed and developed sheep embryos from In-Vitro Fertilization (IVF) according to the parameters of sperm treatment (SPZ) previously established. To achieve this goal 48 Cumulus Oocyte Complex (COCs) was isolated from 35 slaughter-house ovine genital tracts, grown and matured *in-vitro* as described above. Two oocytes samples, one with semen treated and the other (control) with untreated sperm, are submitted to a fecundation. After fertilization and culture, embryos are removed and observed under fluorescent microscopy microcapture laser (LCM) and fluorescence confocal. While the control sample should be discarded at the time of observation by excessive fibrinosis, treated sample revealed 11 expanded blastocysts with intense fluorescence signal in all blastomeres, 6 unfertilized oocytes and 4 malformed embryos showing no signal under fluorescent light.

It is considered as control unfertilized oocytes who did not show any fluorescence as valid evidence to prove the transfection carried out by the SPZ, since only those who were fertilized, in this case all (100%) evidenced strong fluorescence signal in all blastomeres in different samples

Keywords: genetically modified farm animals (GMFA); *in-vitro* fertilization (IVF); epermatozoa (SPZ); cumulus oocyte complex (SPZ); sperm mediated gene transfer (SPZ).