

## **CORDEROS Y TERNEROS MULTITRANSGÉNICOS EXPRESANDO PROTEÍNAS FLUORESCENTES OBTENIDOS POR TRANSFERENCIA DE GENES MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES**

Investigadores USAL:

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

Investigadores Externos:

Vázquez-Levin, Mónica; Iorio, Gabriel

Personal de Apoyo:

Rosales, Juan

Alumnos practicantes USAL:

Menarini, Mercedes; Videla, Daniela; Brutti, Martín; Aguerre, Julia; Farías, Melisa

### **Resumen**

El objetivo de nuestro trabajo fue incrementar la cantidad de embriones y animales de granja adultos reproductivamente viables y genéticamente modificados que se logran por “transferencia de genes mediada por espermatozoides” (TGME). Actualmente resultan escasos los avances en este ámbito, pues las técnicas vigentes son muy costosas y de bajo rendimiento.

A partir de los resultados logrados con la técnica Fecundación In Vitro (FIV) de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de frigorífico, se desarrolló un protocolo que aplica la técnica SMGT por medio de Inseminación Artificial Laparoscópica (IAUL) con semen tratado en ovejas sincronizadas y superovuladas.

Con este fin, 4 ovejas frisonas adultas fueron sometidas a tratamientos hormonales para lograr celos multiovulatorios en fechas prediseñadas. De las cuatro ovejas, todas fueron inseminadas por IAUL, una con semen sin tratamiento (testigo) y tres con semen tratado. Siete días más tarde una de las ovejas inseminadas con semen tratado produjo 9 óvulos, tres de ellos fecundados con diferente estatus de multiplicación celular. Los tres embriones expresaron en todas sus blastómeras los plásmidos incorporados por el espermatozoides tratado. Ninguno de los ovocitos no fecundados evidenció fluorescencia roja o verde. Se utilizaron dos plásmidos, uno que incorpora un gen que expresa una proteína de fluorescencia color rojo (Cy3) y otra que expresa color verde (GFP). Cinco meses más tarde las cuatro ovejas parieron seis corderos (dos con mellizos). Los cuatro corderos de las ovejas inseminadas con espermatozoides tratados resultaron genéticamente modificados, y evidenciaron fluorescencia verde al ser iluminados con luz UV. Los dos corderos de la oveja testigo resultaron negativos bajo la misma iluminación.

Se concluyó que los espermatozoides, apropiadamente tratados con ambos plásmidos, resultaron vectores eficaces para incorporar e integrar el transgen en el genoma resultante de los embri-

nes y de los individuos nacidos viables. Este trabajo fue presentado en las jornadas conjuntas de la Asociación Europea de Transferencia de Embriones y de la Sociedad Brasileira de Tecnología de Embriones en agosto-septiembre de 2016.

**Palabras clave:** animales transgénicos; fecundación in-vitro; espermatozoide

### **Abstract**

The aim was to increase the number of reproductively viable and genetically modified embryos and adult farm animals accomplished by “sperm-mediated gene transfer” (SMGT). Currently, there are few advances in this area because of the low performance of the existing techniques and their excessive cost.

Based on the positive results obtained by In-Vitro Fertilization (IVF) of oocytes obtained from ovaries from abattoir, a protocol was developed that applies the SMGT technique through Laparoscopic Artificial Insemination (IAUL) with semen treated in synchronized and superovulated sheep.

To this aim, 4 adult Friesian sheep were subjected to hormonal treatments to achieve multi-ovulatory oestrus on pre-designed dates. Of the four sheep, all inseminated by IAUL, one (control) was served with semen without treatment and three, with treated semen. Seven days later, one of the sheep inseminated with treated semen produced 9 eggs, three of them fertilized with different cell multiplication status. The three embryos expressed the plasmids incorporated by treated sperm in all their blastomeres. None of the unfertilized oocytes showed red or green fluorescence. Two plasmids were used; one which incorporates a gene that expresses red fluorescence (Cy3) and another that expresses green (GFP) fluorescence protein. Five months later, the four sheep gave birth to six lambs (two with sets of twins). The four ewes that where inseminated with treated spermatozoa gave birth to GM lambs that showed green fluorescence under UV light exposure. The two lambs of the control sheep were negative under the same illumination.

It was concluded that spermatozoa, properly treated with both plasmids, were effective vectors for incorporating and integrating the transgene into the resulting genome of embryos and viable born individuals. This work was presented at the international joint conference of the European Embryo Transfer Association and the Brazilian Society of Embryo Technology in August-September 2016.

**Keywords:** transgenic animals; in-vitro fertilization; spermatozoon