

NUEVAS TÉCNICAS DE MICROMANIPULACION EMBRIONARIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

DF Salamone, R Bevacqua, A Gambini, MI Hiriart, L Moro, N Canel.

Esta revisión resume experimentos de micromanipulación y transferencia de genes en los animales domésticos realizados en nuestro laboratorio. El objetivo no es describir exhaustivamente todas las investigaciones realizadas en este campo, sino presentar los métodos prometedores recientemente desarrollados o evaluados en nuestro laboratorio. Desde el nacimiento de " Dolly ", el primer mamífero clonado obtenido a partir de células somáticas adultas, se han producido crías viables por transferencia nuclear de muchas especies. En esta revisión analizaremos los resultados que tenemos utilizando la clonación por trasplante nuclear (TN) con 3 métodos diferentes y en bovinos, ovinos, caprinos, equinos, porcinos y felinos.

Hemos evaluado los diferentes factores que afectan TN y transgénesis incluyendo la activación química, el efecto de reclonación y la agregación de embriones. También hemos descrito la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que implica la transferencia mecánica de un único espermatozoide en el ooplasma. Recientemente se ha usado la ICSI para la producción de animales transgénicos, por lo que hemos utilizado esta técnica en cinco especies diferentes. Finalmente estudiamos otras estrategias para producir animales transgénicos: la inyección de células del cúmulus y de vesículas ooplásmicas (co-incubación durante 5 min con el transgen). Todos ellos fueron muy eficientes en la expresión del ADN exógeno en los embriones, pero dieron lugar a embriones mosaico. Nuestros estudios también establecieron por primera vez que transgén con un corto periodo de co-incubación con las células somáticas puede producir la expresión del mismo en embriones luego de la TN, y también que el transgen puede ser expresado en embriones de fecundación *in vitro* (FIV) a los cuales se les inyecta vesículas expuestas al ADN exógeno. Se ensayó una mayor simplificación por inyección de cigotos intracitoplasmicamente con complejos ADN-liposomas. En la mayoría de los protocolos obtuvimos una buena tasa de embriones que expresan el transgen, sin embargo después de la transferencia a la hembras receptora no se produjeron nacimientos de animales transgénicos (ovinos y bovinos). Para tratar de tomar ventaja de las nuevas técnicas las usamos para marcar al embrión con eGFP (proteína verde fluorescente) y así generar nuevas técnicas de micromanipulación.

Nuestro primer enfoque consistió en la producción de embriones transgénicos por microinyección en embriones de fecundación *in vitro* con vesículas para luego utilizar estas blastómeras transgénicas como donantes de células para la clonación embrionaria. Obtuvimos una alta eficiencia en la inversión de mosaicismo y multiplicación de los embriones transgénicos. Otra técnica ensayada fue la separación de blastómeros transgénicos de embriones de 8 células seguida por la agregación de un blastómero verde con embriones tetraploides y asincrónicos, pudimos con esta técnica multiplicar con éxito embriones transgénicos y se podrá utilizar para multiplicar embriones de animales de alto valor genético. Hemos demostrado en otra serie de experimentos que los espermatozoides y los oocitos se pueden clonar de manera eficiente. Blastómeras verdes androgénicas haploides se produjeron por la inyección de un solo espermatozoide transfectado con EGFP por ICSI – MGT en oocitos enucleados. Luego de varias divisiones pudieron utilizarse para fertilizar oocitos resultando en varios embriones que expresan el transgen homogéneamente. Este enfoque tiene un gran potencial, ya que permite la determinación del sexo del núcleo copia del espermatozoide antes de la fertilizar diferentes oocitos. También es posible clonar oocitos previamente transfectados seguido por la reconstrucción de embriones bovinos biparental homogéneas. Ambas

técnicas tienen un enorme potencial para seleccionar los genomas y utilizar solo los que contengan la constitución genética deseada sin que necesariamente sean transgénicos. También hemos desarrollado una nueva técnica de transferencia y multiplicación de bajo número cromosómico y mediada por micronúcleos. Se realiza la transferencia nuclear de micronúcleos los que se producen a partir de células somáticas, se los inyecta en un oocito enucleado, y se induce a la maquinaria celular que los replique. Esta metodología permitirá en un futuro el desarrollo de futuras técnicas de micromanipulación.

En conclusión, hemos hecho en el curso de los últimos años avances significativos en la ICSI y clonación así como el desarrollo de nuevas técnicas de micromanipulación que en un futuro podrán ser empleadas para producción animal.

Palabras clave: micromanipulación, la transgénesis, ICSI, la clonación, la transferencia nuclear.

NEW TECHNIQUES OF EMBRYONIC MICROMANIPULATION IN ANIMAL REPRODUCTION

DF Salamone, R Bevacqua, A Gambini, MI Hiriart, L Moro, N Canel.

This review summarizes recent experiments in micromanipulation and gene transfer in domestic animals. The objective is not to exhaustively describe the research done in this field but to present the promising methods recently developed or evaluated in our lab. Since the birth of "Dolly", the first adult somatic cloned mammal, viable offspring has been produced by nuclear transfer (NT) in any species including cattle. In this review we analyzed the results in cloning with 3 different methods in Bovine, ovine, caprine, equine, porcine and feline. We have evaluated different factors that affect NT and transgenesis including the chemical activator, effect of recloning and embryo aggregation. In this review we analyzed the results using cloning by nuclear transplantation with 3 different methods in cattle, sheep, goats, horses, pigs and cats.

We evaluated the different factors affecting transgenesis including TN and chemical activation, recloning, and embryos aggregation. We have also described the intracytoplasmic sperm injection (ICSI), which involves the mechanical transfer of a single sperm in the ooplasm. Recently ICSI has been used for the production of transgenic animals, so we have used this technique in five different species. Finally we studied various strategies to produce transgenic animals: gene transfer mediated by ICSI (ICSI - MGT), injection of cumulus cells and ooplasmic vesicles (co- incubation for 5 min with the transgene). All were very efficient in the expression of exogenous DNA in the embryos, but resulted in mosaic embryos. Our studies also established for the first time that a short period of co-incubation of the transgene with the somatic cells can cause the expression of transgenes in embryos after TN, and also that the transgene can be expressed in embryos of in vitro fertilization (IVF) to which they are exposed to DNA- injected vesicle. Further simplification was tested by injecting zygotes intracytoplasmically with DNA-liposome complexes. In most protocols obtained a good rate of embryos expressing the transgene. However after transfer to females recipient no birth of transgenic animals (sheep and cattle) occurred. To try to take advantage of new techniques we use it to mark the embryo with eGFP (green fluorescent protein) and generate new micromanipulation techniques.

Our first approach was the production of transgenic embryos by microinjection into IVF embryos with vesicles and then use these transgenic blastomeres as donors for embryo cloning. We obtained a high efficiency in the mosaics reversion and multiplication of transgenic embryos. Another technique was tested by separation of transgenic blastomere of 8 cell embryos followed by aggregation of a single green blastomere with a tetraploid and asynchronous embryos, this technique could successfully multiply transgenic embryos and

also it can be used to multiply embryos of high genetic value animals. We demonstrated in another set of experiments that the sperm and the oocytes can be cloned efficiently. Androgenic haploid green blastomeres were produced by injecting a single sperm for ICSI transfected with EGFP-MGT in enucleated oocytes. After several divisions it was able to fertilize oocytes resulting in several embryos expressing. This approach has great potential since it allows the determination of the sex of the sperm nucleus copy before fertilizing different oocytes. It is also possible to clone previously transfected oocytes followed by the reconstruction of homogeneous biparental bovine embryos. Both techniques have enormous potential to select genomes and use only those containing the desired genetic constitution.

We have also developed a new technique of transfer and low number multiplication mediated chromosome and micronuclei. Nuclear transfer is performed micronucleus those produced from somatic cells, they were injected into an enucleated oocyte, and induced the cellular machinery to replicate. This methodology will allow in the future development new micromanipulation techniques. In conclusion we have been made significant advancements in the course of the recent years in the set up of ICSI and cloning and also we introduced new micromanipulation techniques.

Keywords: Micromanipulation, transgenesis, ICSI, cloning, nuclear transfer.