

TRANSFECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS PARA SU POSTERIOR UTILIZACIÓN EN TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATZOIDES (SMGT)

Transfection of bovine sperm for subsequent use in sperm mediated gene transfer (SMGT)

María Elena Arias¹, Andrea Delgado¹, Raúl Sánchez¹, Ricardo Felmer^{1,2}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.19>

¹ *Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de La Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.*

² *Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.*

E-mail: ricardo.felmer@ufrontera.cl

RESUMEN

En bovinos, el progreso de la transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT) ha sido lento debido a la ineficiente internalización del ADN exógeno en los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la transfección de espermatozoides sobre la viabilidad, motilidad espermática y captura de ADN. La transfección se realizó utilizando complejos de ADN plasmidial con Lipofectamina, SuperFect y TurboFect. La viabilidad y captura de ADN se evaluó mediante citometría de flujo y la motilidad mediante el sistema CASA. Los resultados mostraron que todos los espermatozoides transfectados capturan ADN exógeno y que la transfección no afecta la viabilidad espermática. La motilidad sólo se afectó ($P < 0.01$) cuando se utilizó TurboFect. En conclusión, la transfección de espermatozoides utilizando Lipofectamina y SuperFect sería más adecuada para producir embriones transgénicos mediante SMGT vía fecundación in vitro, mientras que TurboFect sería un método más apropiado para producir embriones mediante SMGT vía inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Palabras clave: *Transfección, transgénesis, espermatozoides*

ABSTRACT

In bovine, the progress of sperm-mediated gene transfer (SMGT) has been slow due to the inefficient internalization of exogenous DNA in the sperm. The objective of this study was to evaluate the effect of transfection of sperm on the viability, sperm motility and DNA capture. Transfection was performed with plasmid DNA complexes using Lipofectamine, SuperFect and

TurboFect. The viability and DNA capture was assessed by flow cytometry and the sperm motility through the CASA system. The results showed that all transfection systems allow the capture of exogenous DNA by the sperm and that transfection did not affect the sperm viability. The motility was only affected ($P < 0.01$) with TurboFect. In conclusion, sperm transfection using Lipofectamine and SuperFect would be more appropriate to produce transgenic embryos by SMGT

via in vitro fertilization, while TurboFect would be more appropriate to produce embryos by SMGT through intracytoplasmic sperm injection.

Keywords: *Transfection, gene transfer, sperm.*

INTRODUCCION.

La transgénesis mediada por espermatozoides se basa en la habilidad intrínseca de las células espermáticas de unir e internalizar ADN exógeno y transferirlo a los ovocitos durante la fecundación (Lavitrano *et al.*, 1989). La capacidad de las células espermáticas de capturar ADN foráneo fue descrita por primera vez por Brackett *et al.* (1971), pero se generó un creciente interés en estos resultados sólo luego que Lavitrano *et al.* (1989) describieran la producción de ratones transgénicos utilizando la técnica "transgénesis mediada por espermatozoides" (SMGT). Posteriormente, diferentes investigaciones respaldaron la aplicación de esta técnica en diferentes especies animales.

La SMGT es una técnica que permite la generación de animales genéticamente modificados de una manera simple y limitando el manejo de gametos y embriones, no obstante, el principal inconveniente observado es la baja reproducibilidad de los resultados publicados y la variación con que se expresa el ADN exógeno. La efectividad de la SMGT depende principalmente de la viabilidad y motilidad progresiva del semen (Suarez y Dai, 1992), y de la capacidad de los espermatozoides de unir e internalizar el ADN exógeno (Lavitrano *et al.* 2006). Para maximizar la unión entre ADN exógeno y espermatozoides la calidad inicial del semen y la eliminación del plasma seminal deben estar garantizadas, ya que ambos son factores gravitantes en la SMGT (Lavitrano *et al.*, 2003). Existe información controversial, en relación al efecto del ADN sobre los espermatozoides mamíferos que señala que el ADN exógeno unidos a los espermatozoides generalmente no interfiere con los parámetros espermáticos fisiológicos, como motilidad, incluso en algunos casos las células tratadas desarrollan mejor que las no tratadas (Chan *et al.*, 2000). Sin embargo, otros trabajos demuestran que la unión de ADN exógeno disminuye la viabilidad de los espermatozoides y que los espermatozoides vivos con ADN unido son inmóviles, probablemente como consecuencia de la activación de endonucleasas que fragmentan el ADN y posterior muerte celular, esta último podría corresponder a una protección natural que evita la transmisión de ADN exógeno a la descendencia (Spadafora, 1998).

De acuerdo con estos antecedentes, se destaca la necesidad de desarrollar u optimizar una estrategia en bovinos para facilitar la internalización del ADN

exógeno en los espermatozoides sin afectar su potencial de fecundación y desarrollo embrionario e incrementar la eficiencia de la SMGT.

Actualmente, se dispone de una amplia gama de compuestos de transfección que según sus fabricantes incrementan la transfección de células eucariotas. El compuesto Lipofectamine®LTX-Plus™ a base de liposomas consiste en una formulación especialmente diseñada para estudios de expresión génica en células difíciles de transfectar y en líneas celulares sensibles, mientras que TurboFect®, a diferencia de la transfección a base de lípidos utiliza un polímero catiónico que forma complejos con el ADN compactos y estables, que protegen el ADN de la degradación y facilitan la entrega eficiente del ADN plasmidial en células eucariotas y SuperFect® un reactivo basado en la tecnología de dendrímeros activados desarrollados para incrementar la eficiencia de transfección en un amplio rango de líneas celulares. De esta manera, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes métodos de transfección de espermatozoides, y su efecto sobre la viabilidad, motilidad y captura de ADN, para futuras aplicaciones en la producción de embriones transgénicos mediante SMGT vía ICSI o IVF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y transfección de espermatozoides.

Se utilizó semen congelado de un toro con fertilidad probada (Alta Genetics Inc. Canadá). Se seleccionaron espermatozoides móviles utilizando una gradiente de Percoll (Parrish *et al.* 1995). Fracciones de 1×10^6 espermatozoides fueron incubados durante 30 minutos con $0.5 \mu\text{g}$ de pNunc-HcRed (ADN exógeno), y transfectados con complejos formados por $0.5 \mu\text{g}$ de ADN exógeno y $3 \mu\text{l}$ de Lipofectamina (Invitrogen), $2 \mu\text{l}$ de Supefect (Quiagen) y $3 \mu\text{l}$ de TurboFect (ThermoScientific), respectivamente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante en presencia de medio sp-TL suplementado con 0.2 mM de piruvato y 0.1% de PVA.

Evaluación de la viabilidad espermática y captura de ADN plasmidial.

El plásmido pNunc-HcRed (Clontech) se marcó con isotiocinato de fluoresceína (FITC), utilizando el kit "Nick Translation System" (Invitrogen) y posteriormente se utilizó para transfectar y co-incubar con espermatozoides como se describió arriba. Finalizada la co-incubación o transfección, los espermatozoides fueron tratados con 2.4 mM de yoduro de propidio (Sigma), y analizados mediante citometría de Flujo (FACS CANTO II Becton & Dickinson) para analizar el número de espermatozoides vivos transfectados y muertos transfectados, respectivamente, y la eficiencia de cada método de transfección, en relación a la

cantidad de ADN captada por los espermatozoides medido por la intensidad de fluorescencia.

Análisis de la motilidad espermática.

La motilidad espermática se evaluó a través del sistema de análisis espermático asistido por computador (ISAS®. Proiser). Esto se realizó depositando una alícuota de 2 μ l de espermatozoides en un portaobjetos D4C16 (ISAS®, Proiser). En cada tratamiento, la motilidad fue evaluada en 5 campos con aproximadamente 200 espermatozoides por campo (n=3).

Análisis estadístico

Se efectuó estadística descriptiva en base al promedio y desviación estándar calculados para cada una de las variables analizadas utilizando el software Statgraphics Plus 5.1 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Se analizaron las diferencias entre los tratamientos utilizando ANOVA de una vía después de la transformación arcoseno de los datos proporcionales. Para identificar las diferencias entre los grupos se realizó como post-test la prueba de Scheffe, con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de la transfección sobre la viabilidad espermática y la captura de ADN exógeno.

Tabla 1. Efecto de la transfección sobre la viabilidad espermática y la captura de ADN exógeno.

Tratamiento	% Espermatozoides	
	Transfectados (o ADN unido)	Vivos con ADN unido
Control ADN	99.73 \pm 0.06 ^a	74.93 \pm 6.09 ^a
LipoFect ADN	99.93 \pm 0.06 ^a	86.40 \pm 3.30 ^a
SuperFect ADN	99.97 \pm 0.06 ^a	85.40 \pm 6.56 ^a
TurboFect ADN	100 ^a	77.60 \pm 3.33 ^a

Los datos seguidos en la misma columna por letras iguales no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Se determinó el efecto de la transfección utilizando Lipofectamina, SuperFect y TurboFect, sobre la viabilidad de los espermatozoides y la capacidad diferencial de los espermatozoides transfectados (vivos y muertos) de unir el ADN exógeno. Los resultados mostraron que la totalidad de los espermatozoides luego de ser incubados con ADN (control ADN) y con los complejos ADN/transfectantes, capturan el ADN exógeno (Tabla 1). Además, se observó que la transfección de espermatozoides no afecta la viabilidad espermática, en comparación con

espermatozoides incubados con ADN (control ADN) (Tabla 1).

Efecto de la transfección sobre la cantidad de ADN exógeno captada por los espermatozoides.

Se determinó el efecto de la transfección utilizando Lipofectamina, SuperFect y TurboFect sobre la cantidad de ADN captada por los espermatozoides luego de la transfección. Los resultados mostraron que a pesar que TurboFect generó igual proporción de espermatozoides vivos portadores de ADN, en comparación con el control ADN, Lipofectamina y SuperFect (Tabla 1), los espermatozoides vivos transfectados tenían mayor cantidad de ADN, en comparación con Lipofectamina, SuperFect y el control ADN, respectivamente (Figura 1).

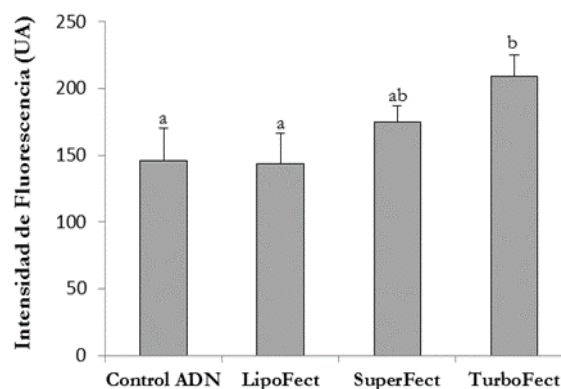


Figura 1. Cantidad de ADN exógeno presente en los espermatozoides vivos transfectados y el control ADN medido por la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA). Las barras seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tabla 2. Valores promedio de motilidad total y progresiva después de la co-incubación con ADN exógeno (control ADN) o un complejo ADN exógeno/transfectante (Lipofectamina, SuperFect o TurboFect, respectivamente).

Tratamiento	Motilidad Total %	Mot. Progresiva %
Control ADN	81.40 \pm 5.44 ^a	55.33 \pm 7.32 ^a
LipoFect ADN	74.50 \pm 10.38 ^a	46.83 \pm 5.63 ^a
SuperFect ADN	70.40 \pm 4.41 ^a	49.50 \pm 4.66 ^a
TurboFect ADN	12.62 \pm 3.15 ^b	3.16 \pm 1.20 ^b

Los datos seguidos en la misma columna por diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.01$).

Efecto de la transfección sobre la motilidad espermática.

Se determinó el efecto de la transfección utilizando Lipofectamina, SuperFect y TurboFect sobre la motilidad total y progresiva. Los resultados revelaron que la transfección utilizando Lipofectamina y SuperFect no afectan la motilidad espermática, en comparación con el control ADN. Sin embargo, los espermatozoides transfectados con TurboFect disminuyeron ($P < 0.01$) su motilidad, en comparación con el control ADN, Lipofectamina y SuperFect, respectivamente (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que los espermatozoides poseen la capacidad intrínseca de unir ADN exógeno, ya que la totalidad de los espermatozoides unieron ADN luego de simple la co-incubación con ADN exógeno, observándose una alta proporción de ellos vivos (>75%). Estos resultados difieren con lo observado por Canovas *et al.*, (2010), quien observaron alrededor de un 13% de espermatozoides vivos con ADN unido luego de incubar espermatozoides con ADN. En relación a la motilidad total y progresiva, los resultados observados son levemente superiores a lo reportado en el estudio de Canovas *et al.*, (2010). Las diferencias podrían deberse a que en el citado trabajo utilizaron una mayor concentración de ADN y tiempos de incubación, ambos factores conocidos por afectar negativamente los parámetros espermáticos (Smith, 2012).

Los resultados de la transfección de espermatozoides indican que los procedimientos de transfección utilizando Lipofectamina y SuperFect, respectivamente, permiten que los espermatozoides puedan capturar ADN en una alta proporción, sin comprometer su viabilidad y motilidad espermática, por lo que serían métodos adecuados para producir embriones mediante SMGT vía fecundación in vitro convencional. Mientras la transfección de espermatozoides utilizando TurboFect parecería más apropiada para producir embriones por SMGT vía inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ya que, este tratamiento promueve la captura de ADN considerablemente, pero afecta la motilidad de los espermatozoides.

CONCLUSIÓN

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales la simple co-incubación de ADN exógeno y la transfección de espermatozoides utilizando Lipofectamina, SuperFect y TurboFect son métodos eficientes para promover la captura de ADN plasmidial por los espermatozoides. Sin embargo,

estudios adicionales son requeridos para evaluar la internalización del ADN exógeno en los espermatozoides y la eficiencia de la transfección sobre la producción in vitro de embriones mediante SMGT.

Agradecimientos.

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 11130724. CONICYT, Chile y Proyecto de Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia. PAI-CONICYT, Chile.

REFERENCIAS

- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:353-357.
- Canovas S, Gutierrez-Adan A, Gadea J. Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. *Mol Reprod Dev* 2010; 77:687-698.
- Chan AW, Luetjens CM, Schatten GP. Sperm-mediated gene transfer. *Curr Top Dev Biol* 2000; 50:89-102.
- Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A. Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:19-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:284-291.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 1989; 57:717-723.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.
- Smith K. Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies. Ed Smith K, Abertay University UK; 2012.
- Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 1992; 46: 686-691.
- Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* 1998; 20:955-64.