

Producción de embriones transgénicos bovinos por microinyección de un vector lentiviral pre y pos fertilización

Production of bovine transgenic embryos by microinjection of a lentiviral vector pre and post fertilization

Produção de embriões transgênicos bovinos por microinjeção de um vetor lentiviral pré e pós-fertilização

RAFAEL OTERO-ARROYO¹, DARWIN HERNÁNDEZ-HERRERA¹, JAIR PÉREZ²

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 11 de Septiembre 2019.

Aprobado para publicación: 13 de Noviembre 2019.

- 1 Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético Animal. Ph.D. Ciencias Veterinarias. Sincelejo, Colombia.
- 2 Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ph.D. Ciencias Agropecuarias; Ph.D. Reproducción animal. Bogotá, Colombia.

Correspondencia: darwin.hernandez@unisucra.edu.co

Cómo citar este artículo: RAFAEL OTERO-ARROYO, DARWIN HERNÁNDEZ-HERRERA, JAIR PÉREZ. (2019). Producción de embriones transgénicos bovinos por microinyección de un vector lentiviral pre y pos fertilización. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 18(1). 64-73, DOI:<http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v18n1.1412>

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue comparar la eficiencia de la microinyección de un vector lentiviral portador del gen eGFP en ovocitos maduros (PRE) y en cigotos (POS) seis horas después de la fertilización in vitro (FIV). Para ello, 1777 ovocitos maduros, fueron distribuidos en 7 tratamientos, uno control (T1), tres PRE (T2_{PRE}, T3_{PRE} y T4_{PRE}) y tres POS (T2_{POS}, T3_{POS} y T4_{POS}) los cuales fueron microinyectados antes (PRE) y después (POS) de la FIV. Los tratamientos T4_{PRE} y T4_{POS} fueron microinyectados con el vector lentiviral. Se evaluó la tasa de producción de blastocistos al día ocho y la expresión de la proteína eGFP en T4_{PRE} y T4_{POS}. No se encontraron diferencias en la tasa de producción de blastocistos entre el tratamiento T1 (20,2%), los controles de cultivo (T2_{PRE} y T2_{POS}) y los controles de microinyección (T3_{PRE} y T3_{POS}). La presencia del vector lentiviral disminuyó ($p < 0,05$) la tasa de formación de blastocistos en los grupos T4_{PRE} y T4_{POS} (5,5 y 3,5%, respectivamente). Todos los blastocistos producidos en T4_{PRE} y el 71,4% producidos en el T4_{POS} expresaron la proteína eGFP ($p < 0,05$), principalmente en el trofoectodermo y en la masa celular interna del blastocisto.

ABSTRACT

The objective of this research was to compare the efficiency of microinjection of a lentiviral vector carrying the eGFP gene in mature oocytes (PRE) and zygotes (POS) six hours after in vitro fertilization (IVF). For this, 1777 mature oocytes were distributed in 7 treatments, one control (T1), three PRE (T2_{PRE}, T3_{PRE} and T4_{PRE}) and three POS (T2_{POS}, T3_{POS} and T4_{POS}) which were microinjected before (PRE) and after (POS) of IVF. The T4_{PRE} and T4_{POS} treatments were microinjected with the lentiviral vector. The blastocyst production rate at day eight and the expression of the eGFP protein in T4_{PRE} and T4_{POS} were evaluated. No differences were found in the blastocyst production rate between the T1 treatment (20,2%), the culture controls (T2_{PRE} and T2_{POS}) and the microinjection controls (T3_{PRE} and T3_{POS}). The presence of the lentiviral vector decreased ($p < 0,05$) the blastocyst formation rate in the T4_{PRE} and T4_{POS} treatments (5,5 and 3,5%, respectively). All blastocysts produced in T4_{PRE} and 71,4% produced in T4_{POS} expressed the eGFP protein ($p < 0,05$), mainly in the trophectoderm and in the internal cell mass of the blastocyst.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi comparar a eficiência da microinjeção de um vetor lentiviral portador do gene eGFP em oócitos maduros (PRE) e zigotos (POS) seis horas após a fertilização in vitro (FIV). Para isso, 1777 oócitos maduros foram distribuídos em 7 tratamentos, um controle (T1), três PRE (T2_{PRE}, T3_{PRE} e T4_{PRE}) e três POS (T2_{POS}, T3_{POS} e T4_{POS}) que foram microinjetados antes (PRE) e depois (POS) da fertilização in vitro. Os tratamentos T4_{PRE} e T4_{POS} foram microinjetados com o vetor lentiviral. A taxa de produção de blastocistos no dia oito e a expressão da proteína eGFP em T4_{PRE} e T4_{POS} foram avaliadas. Não foram encontradas diferenças na taxa de produção de blastocistos entre o tratamento T1 (20,2%), nos controles da cultura (T2_{PRE} e T2_{POS}) e nos controles de microinjeção (T3_{PRE} e T3_{POS}). A presença do vetor lentiviral diminuiu ($p < 0,05$)

PALABRAS CLAVE:

Modificación genética, Proteína verde fluorescente, Transgénesis.

KEYWORDS:

Genetic modification, Green fluorescent protein, Transgenesis

PALAVRAS-CHAVE:

Modificação genética, Proteína fluorescente verde, Transgênesis

a taxa de formação de blastocistos nos grupos $T4_{PRE}$ e $T4_{POS}$ (5,5 e 3,5%, respectivamente). Todos os blastocistos produzidos em $T4_{PRE}$ e 71,4% produzidos em $T4_{POS}$ expressaram a proteína eGFP ($p < 0,05$), principalmente na trofoectoderma e na massa celular interna do blastocisto.

INTRODUCCIÓN

Los organismos genéticamente modificados (OMG) o transgénicos son aquellos que por acción del hombre tienen secuencias de ADN de otra especie en su genoma [1]. El gen que se introduce o transgén, consiste en una construcción que contiene las regiones promotora y codificadora de una proteína de interés, que puede ser de otro animal de la misma especie de una bacteria o planta [2].

Existen varias metodologías para generar animales transgénicos, entre ellas la microinyección pronuclear [3], transferencia de ADN mediada por espermatozoides, transferencia nuclear a partir de células somáticas transfectadas (SCNT) [4], microinyección de ADN pronuclear [5, 6], CRISPR/Cas9 [7], microinyección de transposones [8], vectores retrovirales [9] y nucleasas efectoras tipo activadoras de la transcripción [10], las cuales varían en eficiencia [1].

Cuando se usan vectores retrovirales, los lentivirus son los más utilizados [9]. Estos vectores se obtienen reemplazando los genes virales *gag*, *pulg* y *env* por uno o más genes, mientras que, el conjunto de genes reguladores necesarios para la encapsulación (secuencia ψ), la transcripción reversa (PBS, R, PPT) y la expresión de los genes (LTR) se conservan [9, 11]. Así mismo, el transgén más utilizado, debido a que muestra una expresión estable en células de mamíferos y a que se puede rastrear *in situ* de forma cuantitativa o cualitativa y no invasiva [12] es de la proteína fluorescente verde (eGFP) derivada de la medusa *Aequorea Victoria* [13].

Los primeros animales transgénicos generados utilizando la tecnología de vectores lentivirales se desarrollaron a partir de la microinyección de un vector lentiviral derivado del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) en el espacio perivitelino de ovocitos fertilizados [14]. Luego, la comparación de la técnica microinyección de ADN clásica, con la transferencia de genes en un vector lentiviral resultó en una tasa de cuatro a ocho veces más elevada [15]. Hoy, la técnica se ha masificado a diferentes animales [8], aunque,

todavía existen algunas limitaciones en la utilización de lentivirus, especialmente cuando se hace necesario el uso de altos títulos virales, pues el lentivirus debe sobrepasar la zona pelúcida (ZP) del embrión y la matriz extracelular glicoprotéica que confiere protección externa al embrión [16] incluso contra agentes infecciosos [17]. Así, la ZP acaba actuando como una barrera física que evita la penetración del lentivirus [16]. Por lo tanto, el método preferido para la inyección de partículas virales, es dentro del espacio perivitelino (inyección subzonal) permitiendo que el virus consiga superar la membrana del ovocito o el cigoto, lo que hace necesario el uso de equipos sofisticados para inyección subzonal [16].

Finalmente, los animales transgénicos pueden ser utilizados para la producción de proteínas humanas recombinantes, xenotransplantes, en el estudio *in vivo* de la función de un gen durante la organogénesis, el desarrollo y el envejecimiento, la generación de modelos experimentales en animales para el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedades, así como el estudio de estrategias terapéuticas en modelos de enfermedades y en el sector productivo, esta técnica atiende a programas de mejoramiento genético con rápida multiplicación de animales con características deseables e interés económico [9, 18-20].

En este contexto, el objetivo fue comparar la eficiencia de la microinyección de un vector lentiviral que lleva el gen eGFP en ovocitos maduros (PRE-fertilización) y cigotos seis horas después de la fecundación (POS-fertilización).

MÉTODO

Colecta de los ovarios y manipulación de los ovocitos

Fueron utilizados 720 ovarios colectados de hembras bovinas, sin definir la raza en diferente fase del ciclo estral, sacrificada en frigorífico localizado en la ciudad de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Inmediatamente después del sacrificio y la evisceración, los ovarios fueron removidos e inmersos en nevera térmica con solución fisiológica (0,9% NaCl) suplementada con sulfato de estreptomycin (0,05 g/L), a temperatura entre 35 y 38°C. Al terminar la colecta, los ovarios fueron transportados al laboratorio de reproducción animal de la

Universidad Federal de Viçosa en un tiempo máximo de 30 min. Los ovarios fueron lavados con solución fisiológica, previamente colocada en baño de maría a 37°C, los folículos ováricos (≤ 10 mm) fueron succionados con jeringa. El líquido folicular fue depositado en cálix cónico, a temperatura de 37°C. Una vez ocurrida la decantación de los ovocitos, éstos fueron almacenados en medio Talp-Hepes y luego clasificados morfológicamente [21]. Sólo los ovocitos inmaduros con células del cumulus compacto y con al menos tres capas de células se transfirieron a una placa de Petri que contenía medio Talp Hepes, y posteriormente utilizados en los procedimientos experimentales.

Maduración *in vitro* (MIV)

Se utilizaron 1777 ovocitos madurados en medio TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) (Gibco/Invitrogen) suplementado con FSH (Hormona Foliculo Estimulante) (20 mcg/ml) y suero de vaca en celo (10%). La maduración se realizó en grupos de 50-60 estructuras, depositadas en placas Nunc (Thermo Scientific, Cat.176740) de cuatro pozos, conteniendo 400 μ L de medio de maduración previamente equilibrado por al menos dos horas en incubadora de cultivo celular a 38,5°C con atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂. Los ovocitos se cultivaron en estas condiciones de temperatura y atmósfera durante 22 a 24 horas. Después de haber sido madurados, fueron distribuidos en los respectivos tratamientos.

Tratamientos

Los ovocitos madurados fueron distribuidos en siete tratamientos. El tratamiento 1 (T1) correspondió al control (n=577). Los restantes 1200 ovocitos fueron distribuidos en dos grandes grupos experimentales, identificados como T2_{PRE}, T3_{PRE} y T4_{PRE}, los cuales fueron microinyectados antes (PRE) de la fertilización *in vitro* (n=600) y T2_{POS}, T3_{POS} y T4_{POS}, los cuales fueron microinyectados después (POS) de la fertilización *in vitro* (n=600).

T1 = Control (n=577). Fecundados *in vitro* con complejos cumulus-oócito (CCOs) con una concentración de 1×10^6 espermatozoides (SPTZ)/mL, cultivados en medio CR2 enriquecido con 10% de SFB e incubados a 38,5°C en atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO₂.

T2_{PRE} = Control de medio de cultivo (n=200). Células del cumulus removidas por vórtex en presencia de hialuronidasa, fecundados *in vitro* con una concen-

tración de 1×10^6 SPTZ/mL, cultivados en medio SOF en sachos de aluminio con una mezcla de gases de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ y humedad saturada a una temperatura de 38,5°C.

T2_{POS} = Control de medio de cultivo (n=200). Fecundados *in vitro* con una concentración de 4×10^6 SPTZ/mL durante 6 h, cultivados en medio SOF en sachos de aluminio con una mezcla de gases de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ y humedad saturada a una temperatura de 38,5°C.

T3_{PRE} = Control de microinyección (n=200). Células del cumulus removidas por vórtex en presencia de hialuronidasa, microinyectados con medio TALP y seguidamente fecundados *in vitro* con una concentración de 1×10^6 SPTZ/mL y cultivados en las mismas condiciones del tratamiento T2_{PRE}.

T3_{POS} = Control de microinyección (n=200). Fecundados *in vitro* con una concentración de 4×10^6 SPTZ/mL y cultivados en las mismas condiciones del tratamiento T2_{POS}. Pasadas las 6 h de tiempo de fecundación fueron microinyectados con medio TALP y cultivados en sachos con las mismas condiciones del tratamiento T2_{POS}.

T4_{PRE} = Microinyectados con el lentivirus (n=200). Células del cumulus removidas por vórtex en presencia de hialuronidasa microinyectados con el vector lentiviral y seguidamente fecundados *in vitro* con una concentración de 1×10^6 SPTZ/mL y cultivados en las mismas condiciones de los tratamientos T2_{PRE} y T3_{PRE}.

T4_{POS} = Microinyectados con el lentivirus (n=200). Fecundados *in vitro* con una concentración de 4×10^6 SPTZ/mL y cultivados en las mismas condiciones del tratamiento T2_{POS}. Pasadas las 6 h de tiempo de fecundación fueron microinyectados con el vector lentiviral y cultivados en sachos con las mismas condiciones del tratamiento T2_{POS} y T3_{POS}.

Fertilización *in vitro* (FIV)

Para la fecundación se utilizó semen de un mismo toro y lote de la raza Gir, previamente evaluado en cuanto al vigor, motilidad y concentración. Sólo se utilizaron dosis con motilidad igual o superior al 50% y vigor en el mínimo 3. El semen fue descongelado en baño maría a 37°C durante 30 s, los espermatozoides fueron procesados por el método del gradiente de Percoll (Nutricell) con las concentraciones de

90 y 45% para separación de los espermatozoides móviles en centrifugación, además, de la remoción del diluyente y del plasma seminal. El gradiente de Percoll fue preparado previamente y estabilizado en la incubadora durante 15 min antes de su utilización.

En los tratamientos de microinyección PRE-fertilización ($T2_{PRE}$, $T3_{PRE}$ y $T4_{PRE}$), el semen fue diluido, a una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL, y transferido a las gotas de fecundación (100 μ L de medio FERT-TALP). El proceso de FIV se realizó durante 20 h en incubadora de cultivo celular, en las mismas condiciones de la MIV. La concentración 1×10^6 espermatozoides/mL, fue usada por el hecho de que las células del cumulus eran retiradas de los ovocitos y por el procedimiento de la perforación de la ZP antes de la fecundación, buscando no causar una poliespermia.

En los tratamientos de microinyección POS-fertilización ($T2_{POS}$, $T3_{POS}$ y $T4_{POS}$), el semen fue diluido a una concentración de 4×10^6 espermatozoides/mL, y transferido a las gotas de fecundación (100 μ L de medio FERT-TALP). Los gametos permanecieron co-incubados bajo las mismas condiciones citadas para la MIV por un período de 6 h y por 20 h para el grupo control (T1). La concentración 4×10^6 SPTZ/mL, fue utilizada por el hecho de que los ovocitos de los tratamientos $T2_{POS}$, $T3_{POS}$ y $T4_{POS}$, sólo permanecieron durante 6 h en el medio FERT-TALP y por consiguiente se buscó obtener una mayor tasa de penetración espermática [22].

Vector lentiviral

El vector lentiviral fue producido por transfección transitoria, utilizando cuatro plásmidos: el plásmido de empaque (pMDLg/pRRE), el que codifica para la proteína de envoltura (pMD2.G), el plásmido que codifica para la proteína Rev (pRSV-Rev) (Addgene, EE.UU.) y el plásmido que contiene el transgén (pLGW).

Se utilizó el linaje celular HEK-293F (ATCC CRL 1573) cultivadas en medio DMEM más 10% de SFB hasta alcanzar el estado de 80% de confluencia. La transfección con los vectores lentivirales se realizó con una mezcla que contenía los cuatro plásmidos, en concentración de 6 μ g de ADN de cada uno de los plásmidos estructurales (pMDLg/pRRE, pMD2.G y pRSV-Rev) y 12 μ g del plásmido de interés (pLGW).

Se prepararon dos mezclas por separado: una mezcla de polietilenoimina 18 mM (PEI, Sigma) más glucosa

al 5% y otra mezcla de ADN plasmidial más glucosa al 5%. Se utilizó la relación de 1 μ L de PEI (con pH ajustado a 7) por cada 1 μ g de ADN. Las dos mezclas fueron sometidas a agitación en vórtex durante un minuto y dejadas en reposo por 5 min, luego ambas mezcladas y puestas en agitación vigorosa en vórtex, todo el contenido se mantuvo en reposo durante 10 min, tiempo durante el cual se efectuó un nuevo intercambio de medio sin SFB. Se agregó 1 mL de DMEM sin SFB a la mezcla y, después de la homogeneización, todo el contenido se añadió a la botella de cultivo. Después de 6 h de transfección se añadió SFB al medio para obtener la concentración del 10%. Después de 48 h el medio de cultivo fue centrifugado por 25000 rpm durante 1,5 horas a 4°C. El pellet de lentivirus se resuspendió en 100 μ L de DMEM sin SFB y congelado a -80°C hasta su utilización [12, 23].

Microinyección de los ovocitos PRE-fertilización ($T3_{PRE}$ y $T4_{PRE}$)

Después de la MIV, las células del cumulus fueron removidas de los ovocitos por adición de 0,1% de hialuronidasa en agitación mecánica en vórtex por 5 min. A continuación, los ovocitos desnudos fueron lavados con medio TALP-Hepes y vertidos en placa de Petri para recuperación de los mismos. La evaluación de la maduración nuclear de los ovocitos fue hecha por la observación del corpúsculo polar utilizando estereoscopio (Nikon SMZ 645). Los ovocitos fueron nuevamente lavados en medio TALP y mantenidos en gotas de 20 μ L del medio cubierto con aceite mineral hasta el momento de la microinyección.

La inyección del medio TALP ($T3_{PRE}$) y con el vector lentiviral ($T4_{PRE}$) en el espacio perivitelíneo (subzonal) fue realizada por la observación directa en microscopio invertido (Axiovert 135M, Carl Zeiss) equipado con un sistema de micromanipulación hidráulica (Nikon Narishige NT-88V3), conectado a un sistema de microinyección. Los ovocitos fueron inmovilizados con la pipeta de fijación y, con la micro-aguja cargada, se procedió a la microinyección subzonal con el medio TALP o con la solución que contenía el vector lentiviral, según correspondiera. Durante la manipulación, la zona pelúcida se expandió inmediatamente, y la microinyección fue considerada exitosa cuando la zona pelúcida creció visiblemente. Después de la inyección del TALP o del lentivirus subzonal, los ovocitos fueron lavados tres veces en medio TALP y nuevamente transferidos al medio TCM.

Microinyección de los ovocitos POS-fertilización (T3_{POS} y T4_{POS})

Después de las 6 h del inicio de la FIV, los supuestos cigotos fueron retirados de la gota de fecundación y sometidos a remoción completa de las células del cumulus por agitación mecánica en vórtex por 5 min y luego transferidos a la placa de Petri. Los supuestos cigotos fueron lavados con medio TALP y mantenidos en gotas de 20 µL del medio cubierto con aceite mineral hasta el momento de la microinyección. La inyección del medio TALP (T3_{POS}) y el vector lentiviral (T4_{POS}) en el espacio perivitelíneo (subzonal) fue realizada como se describió para los tratamientos PRE. Después de la inyección del TALP o del lentivirus subzonal, los supuestos cigotos fueron lavados 3 veces en medio TALP y nuevamente transferidos al medio correspondiente. Durante este período, los ovocitos de los tratamientos controles (no microinyectados) permanecieron en el medio FERT-TALP hasta completar 20 h de fecundación.

Cultivo *in vitro* de los embriones (CIV)

Después de la fertilización, los presumibles cigotos fueron retirados de la gota de fecundación, lavados en medio TALP-HEPES, y divididos en dos placas de cultivo. En el tratamiento T1 los supuestos cigotos fueron sometidos al desnudamiento con ayuda de un pipeteador y lavados en medio TALP. El cultivo fue efectuado en gotas de 50 µL de medio CR2 más el 10% SFB bajo aceite mineral, distribuidos en placas de Petri de 10x35 mm. El cultivo fue realizado en incubadora de cultivo celular a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad relativa del 95% [24]. El CIV de los demás tratamientos fue realizado en placas de cuatro pozos tipo Nunc que contenía 500 µL de medio SOF suplementado con 2,5% de SFB, bajo aceite mineral, en grupos de 30-40 estructuras en cada pocillo. Durante todo el cultivo, las placas conteniendo los embriones se colocaron bolsa hermética (Sachet de Aluminio) que contenían una mezcla gaseosa de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ y humedad saturada, mantenidas a una temperatura de 38,5°C.

Evaluación del desarrollo embrionario y de la expresión del eGFP

La tasa de producción blastocistos fue evaluada al día octavo de cultivo (D8) utilizando estereoscopio (Nikon SMZ 645), siguiendo los parámetros descritos por la sociedad internacional de transferencia de em-

briones [25]. La evaluación de la expresión del eGFP fue realizada visualmente, en blastocistos al D8, por medio de la exposición a la luz blanca y ultravioleta en estereomicroscopio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490 nm) o microscopio de fluorescencia (Motic, BA400, filtro de 465- 495 nm). En los blastocistos microinyectados con el vector lentiviral se anotó la posición relativa de la presentación de la fluorescencia.

Análisis estadístico

Las tasas de producción blastocistos en cada tratamiento fueron evaluadas bajo un modelo experimental medidas repetidas así (ecuación 1):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \rho_k + (\tau\rho)_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: Y_{ij} es la tasa de producción de blastocistos al D8 y la tasa de producción de embriones transgénicos en los tratamientos T4_{PRE} y T4_{POS}, μ es el efecto del promedio, τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento (T1, T2_{PRE y POS}, T3_{PRE y POS} y T4_{PRE y POS}), δ_{ij} es el efecto del error asociado al embrión, ρ_k es el efecto k-ésimo periodo (1 al 5), $(\tau\rho)_{ik}$ es el efecto de la interacción tratamiento (τ_i) por periodo (ρ_k) y ε_{ijk} es el error experimental.

Los promedios de cada tratamiento fueron comparados por con el test de Duncan al 5%. Los análisis fueron realizados usando el programa StatPlus:mac v.6.

RESULTADOS

Las tasas de producción de blastocistos encontrados al D8 en el T1 y para los tratamientos PRE (T2_{PRE}, T3_{PRE} y T4_{PRE}) y POS (T2_{POS}, T3_{POS} y T4_{POS}) se presentan en el cuadro 1.

La mayor tasa de formación de blastocistos se encontró en T1, posiblemente debido a que este grupo no fue sometido a la manipulación de remoción de las células de los cúmulos y además permanecieron por 20 h en incubación con los espermatozoides durante el proceso de FIV.

Respecto a los tratamientos PRE-fertilización, se encontró que las tasas de blastocistos entre T1 (20,2%) y T2_{PRE} (16,5%) ($p > 0,05$) confirman que las condiciones atmosféricas y el medio de cultivo utilizado no interfieren con la producción de blastocistos. Así, las

variaciones encontradas pueden ser atribuidas al desarrollo propio de los embriones [18, 21, 22]. La tasa de producción de blastocistos entre T2_{PRE} y T3_{PRE} no varió ($p > 0,05$), lo anterior sugiere que el método de microinyección utilizado en esta investigación, que incluye la perforación de la zona pelúcida, no causa daño ni afectan el desarrollo embrionario (Cuadro 1).

Al igual que lo encontrado en los tratamientos PRE-fertilización, en el T2_{POS} los blastocistos producidos fueron menos respecto al T1, pero sin desviaciones significativas ($p > 0,05$) lo que confirma que las condiciones de CIV no afectaron la producción de blastocistos al D8 [22]. Así mismo, la cantidad de blastocistos formados en los tratamientos T2_{POS} y T3_{POS}, sugieren que la microinyección que incluye la perforación de la ZP no causa daño embrionario.

La comparación entre los tratamientos PRE (T2_{PRE} y T3_{PRE}) y POS (T2_{POS} - T3_{POS}) no mostró diferencias estadísticas en la producción blastocistos ($p > 0,05$). A pesar de la manipulación a la que fueron sometidos los posibles cigotos de los tratamientos T2_{POS} y T3_{POS}, ya que 6 h después del inicio de la FIV, fueron retirados de la gota de fecundación y sometidos a la remoción completa células de *cumulus*. Este procedimiento es necesario para permitir el proceso de micromanipulación que se realiza durante la microinyección del lentivirus.

Solo el 5,5% de los oocitos del T4_{PRE} y el 3,5% del T4_{POS} se desarrollaron hasta blastocisto al día ocho (Cuadro 1), estos porcentajes difirieron ($p < 0,05$) de los tratamientos T1, PRE (T2_{PRE} y T3_{PRE}) y POS (T2_{POS} y T3_{POS}), sugiriendo, que la tasa de producción de blastocistos estuvo influenciada por la presencia del vector lentiviral, cuando este fue microinyectado antes y después de la fertilización.

Cuadro 1. Tasa y porcentaje de producción de blastocistos en cada tratamiento al día ocho (D8).

| T1 | T2 _{PRE} | T3 _{PRE} | T4 _{PRE} |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 101/500 (20,2%) ^a | 33/200 (16,5%) ^{A,a} | 36/200 (18,0%) ^{A,a} | 11/200 (5,5%) ^{A,b} |
| | T2 _{POS} | T3 _{POS} | T4 _{POS} |
| | 31/200 (15,5%) ^{A,a} | 32/200 (16,0%) ^{A,a} | 7/200 (3,5%) ^{B,b} |

^{A,B} promedios en la misma columna sin letra común difieren estadísticamente ($p < 0,05$). Solo incluye los tratamientos PRE y POS.
^{a,b} promedios en la misma fila sin letra común son difieren estadísticamente ($p < 0,05$). Incluye al T1.

Los primeros estudios utilizando vectores lentivirales microinyectados en cigotos presentan una mayor eficiencia que los resultados aquí presentados. La inyección de vectores lentivirales en el espacio perivitellino de cigotos de bovinos logró que entre el 21% [26] y el 22% [15] de los cigotos infectados se desarrollaron hasta el estadio de blastocistos.

En otras especies, las tasas de formación de blastocistos son 76% en embriones de macacos [23] y en cerdos se reporta una tasa 25% [27]. Se ha argumentado que, esta menor tasa de producción de blastocistos en bovinos, sea posiblemente debido a que el genoma lentiviral no es capaz de penetrar de forma eficiente en el pronúcleo bovino [12].

La comparación entre la producción de blastocistos transgénicos se presenta en el Cuadro 2.

En el tratamiento T4_{PRE} el 100% de los blastocistos producidos al día ocho expresaron el transgén de interés (eGFP), mientras que, solo el 71,4% de los blastocistos producidos en el T4_{POS} expresaron la proteína eGFP ($p < 0,05$).

Los resultados indican que la microinyección del vector lentiviral antes de la fertilización *in vitro* es más eficiente que la microinyección después de la fertilización *in vitro*. En este sentido, se debe considerar la influencia de la fase del ciclo celular y del estado de la cromatina sobre la integración de retrovirus. Al respecto, la penetración espermática durante la fecundación *in vitro* inicia con 4 h de cultivo, la formación de los pronúcleos se inicia a las 4 h y dura hasta 11 h, mientras que la síntesis de ADN (fase S) se inicia entre las 14 a 15 h después de la fertilización con una duración de 8 a 10 h [26, 27]. Algunos retrovirus, como el VIH, pueden integrarse en células que no estén en fase de división celular, pero la cro-

Cuadro 2. Tasa y porcentaje de producción de blastocistos (D8) y de embriones transgénicos en los tratamientos T4_{PRE} y T4_{POS}.

| Tratamiento | Blastocistos (D8) | Embriones que expresan eGFP |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|
| T4 _{PRE} | 11/200 (5,5%) ^A | 11/11 (100%) ^A |
| T4 _{POS} | 7/200 (3,5%) ^B | 5/7 (71,4%) ^B |

^{A,B} promedios en la misma columna sin letra común difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

matina descondensada puede facilitar el acceso y la integración correcta del genoma viral [28, 29]. Este puede ser una de las razones por las cuales el uso de los vectores en ovocitos madurados, seguidos de la fecundación es más eficiente [12, 30]. Adicionalmente, es probable que, en los cigotos bovinos, la integración lentiviral se podría retrasar significativamente en presencia de una membrana nuclear, también, que la infección retroviral puede retrasar el clivaje de los embriones, disminuyendo así la capacidad de integración del complejo de pre-integración [15]. También, se ha sugerido que la cantidad de títulos lentivirales usados durante la microinyección tengan un posible efecto deletéreo en la expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario [23] y a los procesos de metilación del ADN que regulación de la expresión génica [31] como posibles aspectos negativos que interfieren en el desarrollo embrionario.

La posición relativa de expresión de la proteína eGFP en los tratamientos $T4_{PRE}$ y $T4_{POS}$ fue evidenciada en el trofotoderma así como en la masa celular interna del blastocisto (Figura 1), confirmando que, los métodos de microinyección del lentivirus son eficientes para la incorporación de un fragmento de ADN en el genoma oocitario.

La expresión de la proteína eGFP fue más alta a la reportada al microinyectar vectores lentivirales en cigotos de bovinos (45%) [27]. En otras especies, en

cerdos la expresión de la proteína eGFP fue del 65% [27], mientras que, utilizando vectores lentivirales desarrollados a partir del genoma de la anemia infecciosa equina (AIE), se obtuvo un 31% de animales transgénicos a partir de cigotos inyectados con virus en el espacio perivitelino y el 95% de los animales fundadores exhibiendo fluorescencia verde [32]. En ovinos, se reporta una producción del 97,4% de embriones transgénicos [12] y en ratones, los reportes varían entre el 90% [14] al 95,5% [33] en la expresión del eGFP.

La expresión de la proteína eGFP puede ser una herramienta para resolver preguntas en la biología del desarrollo embrionario. Se puede utilizar para estudiar las modificaciones epigenéticas, tales como la metilación del ADN, estudio de los procesos biológicos, ya que permite una visualización precisa de la estructura anatómica de los animales transgénicos expresando gen (eGFP), con el fin de obtener una visualización real del órganos y tejidos *in vivo*, también para estudiar las interacciones materno-embionaria [10].

El método aquí utilizado surge como alternativa para modificar genéticamente animales de una forma más segura, rápida y rentable [12] cuando se compara, por ejemplo, con la microinyección pronuclear de ADN [16, 34], en parte, porque se ha demostrado que a diferencia de los retrovirus simples, los lentivirus no puede activar proto-oncogenes por su inserción, también, porque el uso de títulos elevados de vectores lentivirales no necesita altos confinamientos de bioseguridad debido al bajo volumen usado durante las microinyección [12, 16].

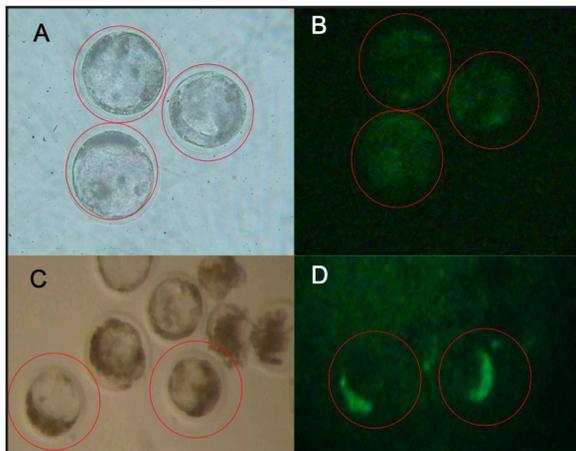
CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo utilizadas y el método de microinyección del vector lentiviral fueron adecuadas, ya que no se encontraron diferencias significativas en la producción de blastocistos entre los tratamientos T1 y los tratamientos PRE ($T2_{PRE}$ y $T3_{PRE}$) y POS ($T2_{POS}$ y $T3_{POS}$).

El vector lentiviral influyó en el desarrollo embrionario, deducido a partir de que el porcentaje de blastocistos encontrado en $T4_{PRE}$ y $T4_{POS}$.

La expresión del transgén en los cigotos producidos fue alta, indicando que las técnicas aquí empleadas (PRE y POS fertilización) son altamente eficientes

Figura 1. Expresión de la proteína eGFP en embriones bovinos en el estadio de blastocisto al día ocho microinyectados con un vector lentiviral. A y B corresponden al $T4_{PRE}$. C y D corresponden al $T4_{POS}$. Micrografía de campo claro (A y C) y de campo oscuro (B y D) expuestas a la radiación ultravioleta, estereomicroscopio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm).



para la obtención de animales transgénicos al compararse con los reportes de la literatura.

La inyección PRE fertilización resultó mayor tasa ($p < 0,05$) de producción embriones transgénicos.

REFERENCIAS

- [1] LAIBLE, G. Production of Transgenic Livestock: Overview of Transgenic Technologies. In: Animal Biotechnology 2: Cham, Berne (Switzerland): Springer International Publishing, 2018, p. 95-121.
- [2] THYGESSEN, P. Clarifying the regulation of genome editing in Australia: situation for genetically modified organisms. *Transgenic Research*, 28(2), 2019, p. 151-159.
- [3] TONELLI, F., LACERDA, S., TONELLI, F., COSTA, G., DE FRANCA, L. and RESENDE, R. Progress and biotechnological prospects in fish transgenesis. *Biotechnology Advances*, 35(6), 2017, p. 832-844.
- [4] MÉNORET, S., TESSON, L., REMY, S., USAL, C., OUISSE, L.H., BRUSSELLE, L., CHENOUIARD, V., NGUYEN, T.H., DAVID, L. and ANEGON, I. Transgenic animals and genetic engineering techniques. *Transgenic Research*, 24(6), 2015, p. 1079-1085.
- [5] LEI, Y., LISHUANG, S., XUEFEI, L., LIGE, B. and GUANGPENG, L. Optimizing protocol for the preparation of transgenic mice (*Mus musculus*) by pronuclear injection. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 24(8), 2016, p. 1278-1284.
- [6] DE OLIVEIRA, S., BAPTISTA, H. and PESQUEIRO, J. Transgenic animals: principles, methods and applications. In: rodent model as tools in ethical Biomedical Research. Cham, Berne (Switzerland): Springer International Publishing, 2016, p. 169-185.
- [7] CHU, V.T., GRAF, R., WIRTZ, T., WEBER, T., FAVRET, J., LI, X., PETSCH, K., TRAN, N.T., SIEWEKE, M.H., BEREK, C., KUHN, R. and RAJWESKY, K. Efficient CRISPR-mediated mutagenesis in primary immune cells using CrispRGold and a C57BL/6 Cas9 transgenic mouse line. *PNAS*, 113(44), 2016, p. 12514-12519.
- [8] YUM, S.Y., LEE, S.J., PARK, S.G., SHIN, I.G., HAHN, S.E., CHOI, W.J., KIM, H.S., KIM, H.J., BAE, S.H., LEE, J.H., MOON, J.Y., LEE, W.S., LEE, J.H., LEE, C.I., KIM, S.J. and JANG, G. Long-term health and germline transmission in transgenic cattle following transposon-mediated gene transfer. *BMC Genomics*, 19(1), 2018, p. 387-399.
- [9] MONZANI, P.S., ADONA, P.R., OHASHI, O.M., MEIRELLES, F.V. and WHEELER, M.B. Transgenic bovine as bioreactors: Challenges and perspectives. *Bioengineered*, 7(3), 2016, p. 123-131.
- [10] CURCIO, A.G., BRESSAN, F.F., MEIRELLES, F.V. and DIAS, A.J.B. Achievements and perspectives in cloned and transgenic cattle production by nuclear transfer: influence of cell type, epigenetic status and new technology. *Animal Reproduction*, 14(4), 2017, p. 1003-1013.
- [11] KARDA, R., PEROCHÉAU, D., BUCKLEY, S. and DELHOVE, J. 305. Generation of light-producing, somatic-transgenic mice using lentivirus and adeno-associated virus vectors. *Molecular Therapy*, 24(1), 2016, p. S123.
- [12] CRISPO, M., VILARIÑO, M., DOS SANTOS, P.C., NÚÑEZ, R., CUADRO, F., BARRERA, N., MULET, A.P., NGUYEN, T.H., ANEGON, I. and MENCHACA, A. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Research*, 24(1), 2015, p. 31-41.
- [13] PRASHER, D.C., ECKENRODE, V.K., WARD, W.W., PRENDERGAST, F.G. and CORMIER, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 1992, p. 229-233.
- [14] LOIS, C., HONG, E.J., PEASE, S., BROWN, E.J. and BALTIMORE, J. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 295(5556), 2002, p. 868-872.
- [15] HOFMANN, A., ZAKHARTCHENKO, V., WEPPERT, M., SEBALD, H., WENIGERKIND, H., BREM, G., WOLF, E. and PFEIFER, A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biology Reproduction*, 71(2), 2004, p. 405-409.
- [16] MIAO, K., GUO, M., AN, L., XU, X.L., WU, H., WANG, D., WU, Z.H. and TIAN, J.H. A new method to efficiently produce transgenic embryos and mice from low-titer lentiviral vectors. *Transgenic Research*, 20(2), 2011, p. 357-363.
- [17] VAN SOOM, A., WRATHALL, A.E., HERRLER, A. and NAUWYNCK, H.J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection?. *Reproduction Fertility Development*, 22(1), 2010, p. 21-31.
- [18] SOSA, M.A.G., GASPERI, R.D. and ELDER, G.A. Animal transgenesis: an overview. *Brain Structure and Functions*, 214(2-3), 2010, p. 91-109.
- [19] LY, J., MESSICK, K., QIN, A., TAKAHASHI, R.H. and CHOO, E.F. Utility of CYP3A4 and PXR-CAR-CYP3A4/3A7 Transgenic mouse models

- to assess the magnitude of CYP3A4 mediated Drug-Drug interactions. *Molecular Pharmaceutics*, 14(5), 2017, p 1754-1759.
- [20] McLaurin, K., Booze, R. and Mactutus, C. Evolution of the HIV-1 transgenic rat: utility in assessing the progression of HIV-1-associated neurocognitive disorders. *Journal of Neurovirology*, 24(2), 2018, p. 229-245.
- [21] Ayala, L., Samaniego, J., Nieto, P., Rodas, R., Dután, J., Calle, G., Murillo, Y., Vásquez, J., Argudo, D. y Perea, F. Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de Cresilo. *Maskana*, 8(1), 2017, p 77-80.
- [22] Otero, R., Hernández, D. and Camargo, L.S. Production of bovine transgenic embryos by microinjection of a lentiviral vector in mature oocytes. *Indian Journal of Science and Technology*, 11(31), 2018, p. 1-8.
- [23] Chan, A.W., Chong, K.Y., Martinovich, C., Simerly, C. and Schatten, G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 291(5502), 2001, p. 309-312.
- [24] Otero, R., Costa, P. e Pereira, M. Maturation nuclear in vitro de ovócitos bovinos seleccionados pelo método azul cresil brilhante. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 9(Sulp2), 2017, p. 345-354.
- [25] IETS. 5th Edition IETS Manual [online]. Web Site; 2018. Disponible en: https://www.iets.org/pub_manual.asp citado 13 julio de 2019.
- [26] Chan, A.W., Homan, E.J., Ballou, L., Burns, J. and Bremel, R. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *PNAS*, 95(24), 1998, p. 14028-14033.
- [27] Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhaue, M., Brem, G., Wolf, E. and Pfeifer, A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Reports*, 4(11), 2003, p. 1054-1060.
- [28] Craigie, R. Nucleoprotein Intermediates in HIV-1 DNA Integration: Structure and Function of HIV-1 Intasomes. In: *Virus Protein and Nucleoprotein Complexes*. Singapore (Singapore): Springer, 2018 p. 189-210.
- [29] Gonçalves, J., Moreira, E., Sequeira, I., Rodrigues, A., Rueff, J. and Brás, A. Integration of HIV in the Human Genome: Which Sites Are Preferential? A Genetic and Statistical Assessment. *International Journal of Genomics* [online]. 2016 Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2016/2168590/abs/> citado 5 de julio de 2019.
- [30] Xu, Y.N., Uhm, S.J., Koo, B.C., Kwon, M.S., Roh, J.Y., Yang, J.S., Choi, H.Y., Heo, Y.T., Cui, X.S., Yoon, J.H., Ko, D.H., Kim, T. and Kim, N.H. Production of transgenic Korean native cattle expressing enhanced green fluorescent protein using a FIV-Based lentiviral vector injected into MII oocytes. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(1), 2013, p. 37-43.
- [31] Tian, Y., Li, W., Wang, L., Liu, C., Lin, J., Zhang, X., Zhang, N., He, S., Huang, J., Jia, B. and Liu, M. Expression of 2A peptide mediated tri-fluorescent protein genes were regulated by epigenetics in transgenic sheep. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 434(3), 2013, p. 681-687.
- [32] Whitelaw, C.B.A., Radcliffe, P.A., Ritchie, W.A., Carlisle, A., Ellard, F.M., Pena, R.N., Rowe, J., Clark, A.J., King, T.J. and Mitrophanous, K.A. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett*, 571(1-3), 2004, p. 233-236.
- [33] Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. and Verma, I.M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *PNAS*, 99(4), 2002, p. 2140-2145.
- [34] Park, F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?. *Physiology Genomics*, 31(2), 2007, p. 159-173.