

# INMUNOLocalIZACIÓN DE ADN EXÓGENO EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS

## Immunolocation of Exogenous DNA in Boar Spermatozoa Under Different Treatments

Francisco Alberto García-Vázquez \*, David Gumbao y Joaquín Gadea

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100-Murcia, España.

Tel. +34-868-888009. Fax: +34-868-884147. E-mail: fagarcia@um.es

### RESUMEN

La transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT) es una técnica basada en la habilidad intrínseca de las células espermáticas de unir ADN exógeno y poder ser usada para la producción de embriones y animales transgénicos. El objetivo de este estudio fue localizar mediante inmunocitoquímica, la unión del transgén en los espermatozoides porcinos sometidos a diferentes tratamientos (frescos-F, congelados/descongelados-CD y congelación rápida-CR) de tal modo que presentaban diferentes grados de alteración de las membranas. Las muestras de semen fueron incubadas con el plásmido (EGFP 5,4 kb) marcado con digoxigenina (DIG) en medio SFM ( $1 \times 10^8$  espermatozoides/mL +  $5 \mu\text{g}$  ADN/mL). Se utilizaron anticuerpos anti-DIG marcados con fluoresceína (FITC) para la localización del ADN mediante el microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides fueron clasificados en 4 categorías según su localización: 1) región acrosomal, 2) región post-acrosomal, 3) en ambas regiones (acrosomal y post-acrosomal), 4) sin ADN unido. Mediante el microscopio de fluorescencia se observaron diferencias en el porcentaje y el patrón de unión en los espermatozoides sometidos a los diferentes tratamientos. Los espermatozoides sometidos a un proceso de CR presentaron un mayor porcentaje de unión que el semen F (CR:  $88,29 \pm 2,38\%$  vs. F:  $63,46 \pm 5,90\%$ ,  $P < 0,01$ ), mientras que el grupo de espermatozoides CD presentó valores intermedios ( $74,00 \pm 3,05\%$ ). Así, en los espermatozoides F el ADN se une principalmente en la región acrosomal (F:  $51,09 \pm 7,70\%$ , FT:  $17,77 \pm 4,49\%$ , CR:  $7,76 \pm 1,58\%$ ,  $P < 0,01$ ). Por otro lado, cuando los espermatozoides CD y CR fueron evaluados, la unión del ADN se localizaba en ambas regiones (F:  $40,04 \pm 5,88\%$ , CD:  $54,82 \pm 2,55\%$ , CR:  $78,09 \pm 1,75\%$ ,  $P < 0,01$ ). En conclusión, existe un patrón de distribución

diferente del ADN exógeno dependiendo del grado de alteración de las membranas espermáticas.

**Palabras clave:** Espermatozoide, ADN exógeno, transgénesis, porcino, SMGT.

### ABSTRACT

Sperm Mediated Gene Transfer (SMGT) is a technique based on the ability of sperm cells to bind exogenous DNA and can be used for the production of transgenic embryos and animals. The aim of this study was the immunolocation of the transgene bound to the spermatozoa after different sperm treatments (fresh-F, frozen-thawed-FT and quick frozen-QF) which induce different degrees of membrane alterations. Sperm samples were incubated with plasmid (EGFP, 5.4 kb) labelled by digoxigenin (DIG) in SFM medium ( $1 \times 10^8$  sperm/mL +  $5 \mu\text{g}$  DNA/mL). Anti-DIG labelled by FITC antibody was used for the localization of the DNA and observed by epifluorescent microscopy. Spermatozoa were classified in 4 categories according to DNA localization in the spermatozoa head: 1) in acrosomal region, 2) in post-acrosomal region, 3) in both regions (acrosomal and post-acrosomal regions), 4) DNA not bound. Using epifluorescent microscopy it was observed differences in the binding pattern after different sperm treatments, so in F sperm the DNA-binding is mainly localized in the acrosomal region (F:  $51.09 \pm 7.70\%$ , FT:  $17.77 \pm 4.49\%$ , QF:  $7.76 \pm 1.58\%$ ,  $P < 0.01$ ). On the other hand, when FT or QF spermatozoa were evaluated the DNA-binding tends to be in both regions (F:  $40.04 \pm 5.88\%$ , FT:  $54.82 \pm 2.55\%$ , QF:  $78.09 \pm 1.75\%$ ,  $P < 0.01$ ). In conclusion, there is a different exogenous DNA distribution in sperm depending on level of plasma membrane damage.

**Key words:** Spermatozoa, exogenous DNA, transgenesis, porcine, SMGT.

## INTRODUCCIÓN

La transgénesis ha sido uno de los más recientes e importantes avances en la biotecnología animal, existiendo aplicaciones en diversas áreas, tales como la investigación biológica, biomédica, genética (genes implicados en el cáncer, regulación del sistema inmunológico, control del crecimiento), agropecuaria (mejora de la producción, resistencia a enfermedades) o modelos animales como donadores de órganos [10].

Hasta el momento, la microinyección pronuclear del material genético ha sido la técnica más utilizada para la generación de animales transgénicos [16]. Esta metodología es eficiente en ratón (*Mus musculus*), pero no así en las especies domésticas donde presenta unos bajos rendimientos junto con unos costos muy elevados. Para solventar este problema se han desarrollado otros métodos alternativos para generar animales transgénicos como vectores retrovirales, células madre o transferencia nuclear [11]. Sin embargo, su eficiencia hasta el momento es baja. Una posible alternativa viable a dichas técnicas es la de aprovechar la capacidad que tienen los espermatozoides de captar y transferir ADN exógeno [3]. Esta técnica, denominada "Transgénesis mediada por espermatozoides" (SMGT) presenta varias ventajas como son: la "relativa" sencillez de la técnica, bajo costo y mayor eficiencia [21, 29].

En el desarrollo de esta metodología existe cierta controversia respecto al hecho que sean los espermatozoides muertos o con alteración de sus membranas los que se unan al ADN. Según algunos autores, los espermatozoides muertos de ratón [21], de cerdo (*Sus scrofa*) [19] y humanos [4] no tienen capacidad de unirse al ADN. Sin embargo, Perry y cols. [29] utilizan espermatozoides muertos debido al tratamiento de permeabilización que aplican (Tritón X-100, congelación/descongelación rápida, liofilización), y demuestran que dichas células al co-incubarlas con el plásmido e inyectarlas mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), son capaces de fecundar y dar lugar a embriones transgénicos. Posteriormente, se ha publicado un gran número de trabajos que han confirmado el uso de espermatozoides con membranas alteradas [26, 27, 32].

Un punto clave en esta técnica es el proceso de unión espermatozoide-ADN [22]. A lo largo de los años se han utilizado diferentes técnicas para determinar la interacción de las moléculas exógenas de ADN con los espermatozoides. Entre éstas se encuentran la microscopía electrónica [9], recuento por centelleo [8], autorradiografías [23, 24], microscopía confocal [6, 7] y de fluorescencia [1, 5, 25]. En 1991, las primeras evidencias que confirman el lugar de unión se realizaron mediante análisis autorradiográficos (métodos de visualización con el uso de radioisótopos), donde se muestra que la unión de las células espermáticas y el ADN están localizados preferentemente en la mitad posterior de la cabeza espermática correspondiente al área nuclear [23, 24]. Esta distribución ocurre en ratón y en otras especies como bovino (*Bos taurus*) [9]. El

mismo patrón es observado en espermatozoides de cerdo, pero parte de ese ADN también se distribuye en otros lugares de la cabeza [12].

El propósito de esta experiencia fue evaluar el porcentaje de unión y la localización del ADN exógeno en espermatozoides sometidos a tratamientos que llevan asociados diferentes grados de alteración de sus membranas (intactos, espermatozoides sometidos a un proceso de congelación rápida y criopreservados).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

El semen utilizado provino de verracos (Landrace-Large White) entre 2 y 5 años de edad, de fertilidad comprobada pertenecientes al centro de inseminación artificial de la granja Lo Navarro S.A. (Murcia, España). La frecuencia de recogida de semen era de 1-2 veces por semana. Los animales estuvieron alojados en habitáculos individuales mantenidos a temperatura controlada (25°C) y bajo condiciones naturales de luz y humedad. En total se utilizaron 10 eyaculados diferentes.

### Medio utilizado para el procesado espermático

El medio utilizado para la dilución y lavado de los espermatozoides fue el *Swine Fertilisation Medium* (SFM) descrito previamente por Lavitrano y col. [22]. Este medio está compuesto por glucosa (11,25 gr/L), citrato sódico (10 gr/L), EDTA (4,7 gr/L), ácido cítrico (3,25 gr/L) y Trizma (6,5 gr/L). Posteriormente fue suplementado con 6 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). El pH final del medio fue ajustado a 6,8. Los reactivos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

### Construcción y marcado del ADN

El plásmido EGFP utilizado en este trabajo, contiene el promotor temprano citomegalovirus (CMV) humano y fue obtenido de *Clontech* (pEGFP-N1 5,4 Kpb, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, EUA). El plásmido se hizo lineal mediante el uso de endonucleasas de restricción (Afl II). Finalmente, el plásmido lineal fue marcado con la molécula digoxigenina (DIG). La incorporación del nucleótido marcado en el ADN sintetizado disminuyó su movilidad electroforética con respecto al ADN no marcado [17].

### Recogida del semen y procesado de espermatozoides

La recogida de semen se realizó mediante el método manual [20]. La primera fracción del eyaculado (concentración baja de espermatozoides) fue eliminada, y la fracción rica en espermatozoides fue recogida en un termo (Inoxterm 0,7 L, Valira® S.A., Reus, España) previamente esterilizado en autoclave (Nüve OT-032, Nüve® Basic Laboratory Equipment, Ankara, Turquía), precalentado a 37°C (para evitar el choque tér-

mico) (Incubador Heraeus 3111, Heraeus Instruments, Pharma Scientific, Inc. EUA) y filtrada mediante gasas estériles para descartar las secreciones de la glándula de Cowper. Inmediatamente tras la recolección del eyaculado, el semen fue diluido 1:1 en medio SFM sin BSA, precalentado a 37°C.

El semen fue preparado por el método descrito por Lavitrano y cols. [22]. Tras la recogida de la fracción rica del eyaculado y la dilución del semen 1:1 en medio SFM sin BSA, fue trasladado al laboratorio en un termo eléctrico (AMS, Modelo FH15, China) a 37°C. Una vez en el laboratorio, se diluyó de nuevo en medio SFM (37°C) en una proporción de 1:10 (5 mL semen 1:1 + 45 mL medio) en tubos Falcon®, y se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C (Centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf Ibérica S.L. Madrid, España).

Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en SFM (en este caso con BSA) a 25°C, posteriormente se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C; se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL del medio con BSA a 25°C. Finalmente, se calculó la concentración final mediante un sistema fotométrico (SpermaCue®, Minitub Ibérica S.L., Tarragona, España) y se ajustó la concentración de la suspensión espermática a  $10^8$  células espermáticas/mL a los que se le añadió 5 µg de ADN exógeno/mL (solución *stock* de ADN 200 µg/mL).

### Tratamientos espermáticos

Congelación de espermatozoides. Los espermatozoides fueron congelados de acuerdo al protocolo descrito por Westendorf y col. [35] y preservados en nitrógeno líquido en pajuelas de 0,5 mL hasta el momento de su uso. Las pajuelas fueron descongeladas en un baño (BM 402, Nüvc, Ankara, Turquía) a 52°C durante 12 seg [30] y resuspendidas en SFM (atemperado a 37°C, ratio 1:5). Se lavó la muestra dos veces mediante centrifugación (Centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf Ibérica S.L. Madrid, España) durante 10 min a 800g y 25°C para eliminar el medio de congelación y los restos celulares. Finalmente, el pellet fue resuspendido en medio SFM hasta alcanzar la concentración de trabajo ( $10^8$  espermatozoides/mL).

Ruptura de las membranas por congelación/descongelación rápida. Para provocar la alteración estructural de las membranas espermáticas, los espermatozoides fueron sometidos a un proceso rápido y repetido de congelación/descongelación. Para ello, se introdujo una suspensión de espermatozoides en un baño de nitrógeno líquido durante 20 seg, seguido de la inmediata descongelación por inmersión en un baño de agua atemperada (BM 402, Nüve, Ankara, Turquía) a 37°C. Este proceso se repitió 3 veces. Tras el proceso se confirmó, mediante la observación microscópica de las muestras teñidas con Ioduro de Propidio, que todas las células espermáticas tenían alteraciones graves de la estructura de su membrana.

### Inmunolocalización

Se utilizó un anticuerpo (Ab) antiDIG marcado con el fluorocromo fluoresceína (FITC) (Antidigoxigenin-Fluorescein, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) que permitió poner de manifiesto el anticuerpo mediante el uso de un microscopio de fluorescencia (Leica® DMLS, Leica Microsistemas, Barcelona, España). En primer lugar, los espermatozoides fueron incubados con el plásmido marcado con DIG. Transcurrido el período de incubación (24h), los espermatozoides fueron centrifugados a 300g x 5 min para eliminar el exceso de plásmido no unido y el precipitado se resuspendió para su fijación en paraformaldehído al 1% y se conservó en la nevera (4°C) (Matek® AFI-882/2C, SCLAB-Sistemas de clima para laboratorio S.L., Barcelona, España) hasta el momento del marcaje. Para el ensayo, los espermatozoides fueron lavados previamente mediante centrifugación a 300g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en PBS. A partir de las suspensiones resultantes se realizaron las extensiones espermáticas en sus portaobjetos correspondientes, y una vez secadas al aire se lavaron 3 veces durante 5 min en PBS. Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se realizó un bloqueo previo con PBS al 1% de BSA durante 15 min. Se incubó en cámara húmeda (para evitar el secado del medio con anticuerpo) y a temperatura ambiente con el anticuerpo antiDIG-FITC (diluido 1:10 en PBS-1% BSA: 495 µL de PBS-BSA 1% y 5 µL de Ab) durante 1 h. Se realizó un nuevo lavado de las muestras (3 veces durante 5 min). Sin dejar secar, se montaron los cubreobjetos con las muestras empleando cubres redondos y medio de montaje para fluorescencia (Dako, Fluorescent Mounting Medium, Dako Diagnósticos, S.A., Barcelona, España).

Los espermatozoides se analizaron haciendo uso de microscopía de fluorescencia (Leica® DMLS, Leica Microsistemas, Barcelona, España), mediante filtro de excitación a 580 nm y bajo objetivo de inmersión (100X).

### Análisis estadístico

Los resultados de las variables estudiadas se expresaron como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) incluyendo el tratamiento espermático como factor principal. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el Test de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad de  $P < 0,05$ . Para todo el estudio estadístico se utilizó el programa Systat v11 (Systat Software Inc., 2004. Richmond, CA, EUA).

### Diseño experimental

El propósito de esta experiencia fue localizar en qué lugar específico del espermatozoide se unía el transgén. Para ello, el ADN utilizado había sido marcado previamente con digoxigenina (DIG). Se estudiaron, tanto espermatozoides intactos como espermatozoides sometidos a un proceso de conge-

lación rápida o bien congelados según el protocolo habitual empleado en el laboratorio. Para dicha localización se empleó la inmunocitoquímica, empleando anticuerpos anti-DIG con la intención de poder evidenciar la presencia del material génico ligado o no a los espermatozoides a través de microscopía de fluorescencia (ensayo ab-FITC). Una vez marcados los espermatozoides, estos se clasificaron según la localización del ADN: 1) ADN en región acrosomal, 2) ADN en región post-acrosomal, 3) ADN en región acrosomal y post-acrosomal, 4) espermatozoides sin ADN unido.

Se evaluaron un total de 400 espermatozoides por ensayo. Se realizaron 3 replicados de espermatozoides intactos, un total de 7 replicados para espermatozoides congelados-descongelados y 3 para congelación rápida, además del control (espermatozoides no incubados con ADN).

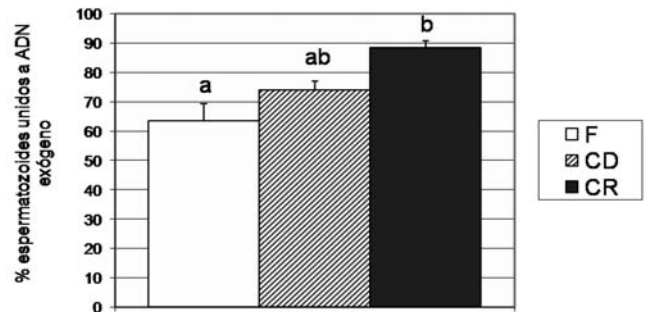
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los espermatozoides frescos (intactos) se unen en menor proporción al ADN que los espermatozoides sometidos a un proceso de congelación y descongelación y a su vez menos que los espermatozoides con alteraciones de sus membranas por congelación rápida (FIG. 1;  $P < 0,01$ ). Se analizaron por separado, cada una de ellas, expresando en la TABLA I, el porcentaje de unión al ADN en cada una de las zonas. De este modo, el porcentaje de unión a los acrosomas, sumado a la unión en la región post-acrosomal y al de unión a toda la cabeza espermática suma el 100%.

En estudios previos realizados en el laboratorio [14, 15] se evaluó mediante el citómetro de flujo (Coulter Epics XL, Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, EUA), la unión del plásmido EGFP a los espermatozoides sometidos a diferentes grados de alteración de las membranas espermáticas mediante tratamientos físicos (congelación-descongelación y congelación rápida) o químicos mediante el uso del detergente Tritón X-100 (TX-100). Al igual que en el presente trabajo, los resultados obtenidos mostraron que, los tratamientos más agresivos y que producen una alteración más severa de la membrana del espermatozoide, como la congelación rápida y TX-100 arrojaron los mayores porcentajes de unión con el transgén (90 y 97%, respectivamente). Además, la aplicación de los diferentes tratamientos espermáticos dieron lugar a diferentes porcentajes de embriones “transgénicos” mediante ICSI, obteniendo resultados con el uso de espermatozoides CR de un 80% de embriones que expresaban la proteína verde fluorescente.

La unión entre el plásmido y los espermatozoides no solo puede estar modulada por los diferentes tratamientos espermáticos como ha sido analizado, sino que también puede depender de otros factores, como son entre otros: el verraco donante utilizado, proteínas del plasma seminal, medios y tiempos de incubación [13, 22].

Por otro lado, en este estudio se observó que el semen fresco, además de presentar el menor porcentaje de unión al



*a, b indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).*

**FIGURA 1. UNIÓN DEL ADN EXÓGENO A ESPERMATOZOI-  
DES SOMETIDOS A DIFERENTES GRADOS DE PERMEABI-  
LIZACIÓN DE SUS MEMBRANAS (FRESCOS-F, CONGELA-  
DOS/DESCONGELADOS: CD, CONGELACIÓN RÁPIDA: CR)  
TRAS 24H DE INCUBACIÓN.**

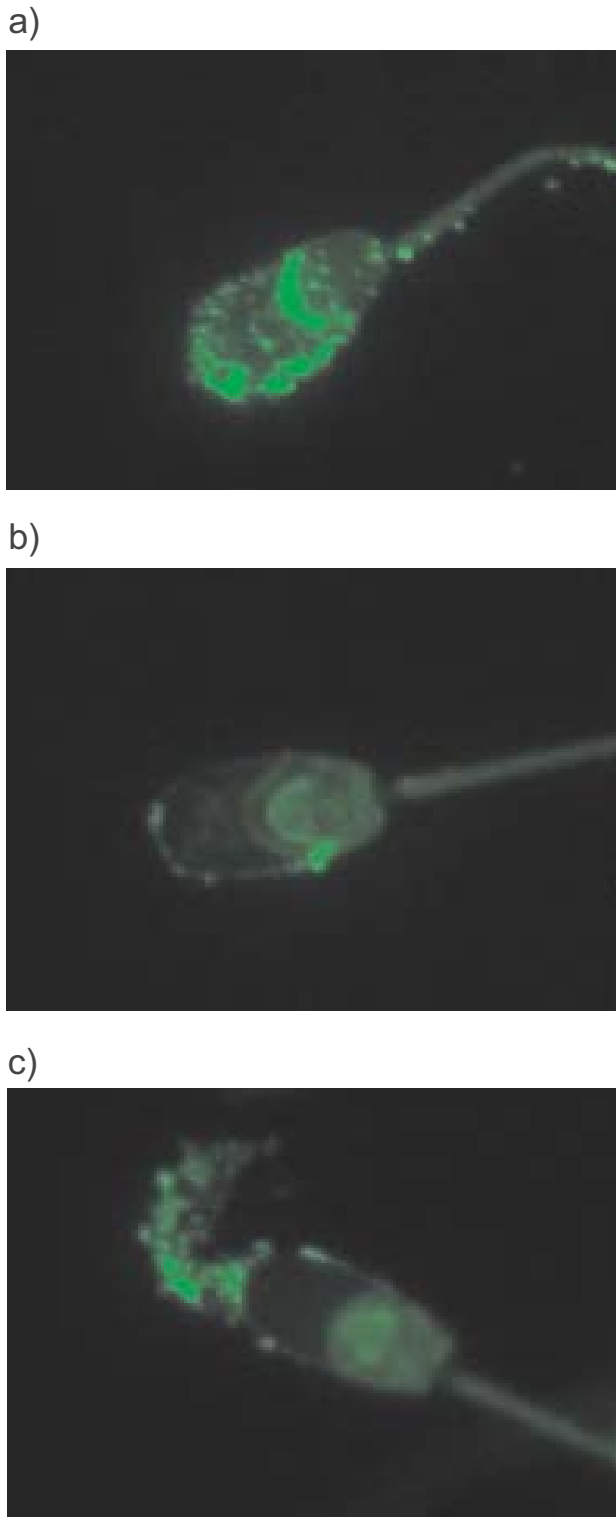
**TABLA I  
LOCALIZACIÓN DEL ADN EXÓGENO MEDIANTE FITC,  
EN ESPERMATOZOI-  
DES SOMETIDOS A DIFERENTES  
GRADOS DE PERMEABILIZACIÓN DE SUS MEMBRANAS  
(INTACTOS, CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN,  
CONGELACIÓN RÁPIDA). SE CLASIFICARON LOS  
ESPERMATOZOI-  
DES SEGÚN EL PATRÓN DE  
DISTRIBUCIÓN DEL ADN EXÓGENO EN REGIÓN  
ACROSOMAL, POST-ACROSOMAL O AMBAS.**

Tratamiento espermático	Acrosoma	Post-acrosomal	Ambas
Frescos	51,09 ± 7,70 <sup>a</sup>	8,87 ± 3,50 <sup>a</sup>	40,04 ± 5,88 <sup>a</sup>
Congelación-descongelación	17,77 ± 4,49 <sup>b</sup>	27,41 ± 4,38 <sup>b</sup>	54,82 ± 2,55 <sup>b</sup>
Congelación rápida	7,76 ± 1,58 <sup>b</sup>	14,15 ± 1,68 <sup>a</sup>	78,09 ± 1,75 <sup>c</sup>
P	<0,01	<0,01	<0,01

*a, b, c en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).*

ADN, las células se unen el plásmido mayoritariamente en la región acrosomal (TABLA I y FIG. 2a;  $P < 0,01$ ). Cuando los espermatozoides son sometidos a un proceso de congelación (congelación-descongelación y congelación rápida), aumenta la proporción de espermatozoides unidos, pero además varía el patrón de unión, ya que tiende a unirse en toda la cabeza espermática (TABLA I y FIGS. 2b y c). Además, en la mayoría de los espermatozoides que tenían los acrosomas dañados (sobre todo por procesos de congelación), el ADN se encontraba localizado concretamente en el contenido acrosomal.

El ADN exógeno en la célula espermática puede ser transferido a los ovocitos y ser capaz de fecundarlos. Como ya se ha evidenciado, este fenómeno ocurre en diferentes especies y ha sido explotado en los últimos años para la generación de embriones y animales modificados genéticamente [33]. La membrana plasmática de los espermatozoides juega un pa-



**FIGURA 2. IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (1000X) DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS CON ANTICUERPOS ANTI-DIG MARCADOS CON FITC. LAS IMÁGENES MUESTRAN LAS DISTINTAS LOCALIZACIONES DEL PLÁSMIDO EN LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS: A) UNIÓN EN REGIÓN ACROSOMAL; B) UNIÓN EN REGIÓN POST-ACROSOMAL; C) UNIÓN EN REGIÓN ACROSOMAL Y POST-ACROSOMAL.**

pel crucial: cuando la membrana está intacta, como ocurre en la interacción directa espermatozoide-ADN, la unión de las moléculas de ADN a la superficie de la célula desencadena el mecanismo de interiorización y como consecuencia ocurre una transcripción inversa o reversa, formando mayoritariamente la generación de moléculas episomales de ADN (es decir, que el ADN exógeno no se encuentra integrado en el genoma del espermatozoide) [34]. Por el contrario, la destrucción de la membrana facilitaría la interacción directa con la cromatina de los espermatozoides incrementando la posibilidad de integración. También es posible que se favorezca la unión a regiones accesibles en el ADN espermático (ADN fragmentado) que mediante los mecanismos de reparación del ADN que presenta el ovocito favorezcan los procesos de integración, como sugieren Moreira y col. [28].

Esta integración puede ocurrir rápidamente en el núcleo espermático (“espermatozoides transgénicos”) o más tarde en los ovocitos, cuando el núcleo espermático se convierte en el pronúcleo masculino [33]. Spadafora [34] sugiere que el paso de integración del transgén en el ADN cromosómico del espermatozoide no es necesariamente un prerrequisito para obtener animales transformados genéticamente. De hecho, no hay ninguna evidencia directa contra la posibilidad que el plásmido sea transferido como tal al ovocito e integrado en el cigoto o en núcleos embrionarios en fases posteriores.

En los resultados obtenidos se han encontrado 3 patrones diferentes de unión: región acrosomal, post-acrosomal o en ambas regiones a la vez. Del mismo modo, Anzar y Buhr [1], mediante el análisis con el microscopio de fluorescencia, encuentran similares localizaciones del plásmido en espermatozoides de toro (*Bos taurus*) descongelados. Mientras que Gandolfi y col. [12], utilizando espermatozoides porcinos y una técnica de evaluación con digoxigenina, observaron una distribución análoga.

En el proceso de congelación rápida de los espermatozoides se produce una mayor unión, tanto en región acrosomal como post-acrosomal. Perry y col. [29] analizaron mediante microscopía electrónica, los espermatozoides de ratón con las membranas alteradas en diferentes grados (Tritón X-100, congelación rápida, congelación-secado), observando que con estos tratamientos el lugar donde se producía mayor alteración en el espermatozoide era la región acrosomal, por lo que se deduce que los lugares donde las membranas están permeabilizadas se produce en mayor medida la unión. Además, se observó que, cuando se realizaron los tratamientos de congelación-descongelación y congelación rápida, la mayoría de los espermatozoides presentaron los acrosomas alterados o reaccionados, estando el transgén localizado propiamente en el contenido acrosomal, por lo que la reacción acrosómica no tiene una influencia negativa en la habilidad de las moléculas de ADN para unirse a los espermatozoides de porcino [19].

Igualmente, el plásmido se encuentra localizado en la región post-acrosomal, siendo mayoritaria esta unión en los pro-

cesos de congelación rápida al tener sus membranas un mayor grado de alteración. En otras investigaciones llevadas a cabo mediante autorradiografías de células espermáticas de ratón incubadas con el plásmido marcado con  $^3\text{H}$ , se mostró que la radioactividad asociada al ADN con los espermatozoides se encuentra principalmente en el segmento subecuatorial de la cabeza [23].

Es conocida la presencia de distintos dominios en los espermatozoides con diferente composición y funciones [18]. La membrana plasmática en la región post-acrosomal está implicada en el proceso de la fusión de los gametos en los pasos finales de la fecundación [2, 9, 31, 36]. También es sabido que, la región apical y el segmento ecuatorial del acrosoma no se incorporan a la membrana plasmática del ovocito en el proceso de fecundación pero son interiorizados por el ovocito en forma de vesículas creadas por las membranas espermáticas y ovocitarias [4]. La función de estas vesículas no es bien conocida pero puede transportar el ADN dentro del ovocito [4].

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El grado de unión del ADN exógeno al espermatozoide es mayor cuando éstos han sufrido procesos de congelación. Además, dependiendo del grado de alteración de las membranas espermáticas existe un patrón de distribución diferente del ADN exógeno estando el ADN localizado principalmente en la región acrosomal y post-acrosomal cuando las células espermáticas fueron sometidas a procesos de congelación.

Mediante la técnica de transgénesis SMGT, diversos grupos de investigación han obtenido lechones transgénicos con diferentes grados de eficiencia y mediante el uso de diferentes alternativas como la inseminación artificial (tradicional o quirúrgica), o la ICSI mediante métodos pasivos o activos (uso de recombinasas o trasposasas).

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos BIOCARM 10BIO2005/01-6463, MEC-FEDER AGL2009-12512-C02-01 y Fundación Séneca (08752/PI/08).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANZAR, M.; BUHR, M.M. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. **Theriogenol.** 65:683-690. 2006.
- [2] BEDFORD, J.M.; MOORE, H.D.; FRANKLIN, L.E. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. **Exp. Cell. Res.** 119:119-126. 1979.
- [3] BRACKETT, B.G.; BORANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 68:353-357. 1971.
- [4] CAMAIONI, A.; RUSSO, M.A.; ODORISIO, T.; GANDOLFI, F.; FAZIO, V.M.; SIRACUSA, G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa specific localization of DNA on sperm heads. **J. Reprod. Fertil.** 96:203-212. 1992.
- [5] CARBALLADA, R.; ESPONDA, P. Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. **Exp. Cell. Res.** 262:104-113. 2001.
- [6] CHAN, A.W.; LUETJENS, C.M.; DOMINKO, T.; RAMALHO-SANTOS, J.; SIMERLY, C.R.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. **Mol. Hum. Reprod.** 6:26-33. 2000a.
- [7] CHAN, A.W.; LUETJENS, C.M.; DOMINKO, T.; RAMALHO-SANTOS, J.; SIMERLY, C.R.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. Transgen-ICSI reviewed: foreign DNA transmission by intracytoplasmic sperm injection in Rhesus monkey. **Mol. Reprod. Dev.** 56:325-328. 2000b.
- [8] CHANG, K.; QIAN, J.; JIANG, M.; LIU, Y.H.; WU, M.C.; CHEN, C.D.; LAI, C.K.; LO, H.L.; HSIAO, C.T.; BROWN, L.; BOLEN, J. J.R.; HUANG, H.I.; HO, P.Y.; SHIH, P.Y.; YAO, C.W.; LIN, W.J.; CHEN, C.H.; WU, F.Y.; LIN, Y.J.; XU, J.; WANG, K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. **BMC Biotechnol.** 2:5. 2002.
- [9] FRANCOLINI, M.; LAVITRANO, M.; LAMIA, C.L.; FRENCH, D.; FRATI, L.; COTELLI, F.; SPADAFORA, C. Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. **Mol. Reprod. Dev.** 34: 133-139. 1993.
- [10] GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A. Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal. **Rev. ITEA.** 106:15-30. 2010a.
- [11] GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A. Métodos de generación de cerdos transgénicos. **Rev. ITEA.** 106: 31-45. 2010b.
- [12] GANDOLFI, F.; TERQUI, M.; MODINA, S.; BREVINI, T.A.; AJMONE-MARSAN, P.; FOULON-GAUZE, F.; COUROT, M. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. **Reprod. Fertil. Dev.** 8:1055-1060. 1996.
- [13] GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A. Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina: Factores que afectan a la eficiencia de la técnica. Servicio de Publicaciones Universidad de Murcia. Tesis de Grado. Pp. 1-414. 2008.

- [14] GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GUTIERREZ-ADAN, A.; GADEA, J. Effect of the sperm treatment on efficiency of porcine transgenic embryo production by ICSI-SMGT. **Theriogenol.** 72: 506-518. 2009.
- [15] GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; GADEA, J. Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides porcinos eyaculados y epididimarios. **Arch. Med. Vet.** 41: 131-138. 2009.
- [16] GORDON, J.W.; RUDDLE, F.H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Sci.** 214:1244-1246. 1981.
- [17] GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PINTADO, B. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos. **Transgenic Res.** 9:81-89. 2000.
- [18] HOLT, W.V. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. In: **International Review of Cytology** G. H. Bourne & J. F. Danielli.(Eds) Academic Press, New York. Pp 159-194. 1984.
- [19] HORAN, R.; POWELL, R.; MCQUAID, S.; GANNON, F.; HOUGHTON, J.A. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. **Arch. Androl.** 26:83-92. 1991.
- [20] KING, G.J.; MACPHERSON, J.W. A comparison of two methods for boar semen collection. **J. Anim. Sci.** 36:563-565. 1973.
- [21] LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V.M.; DOLCI, S.; FARACE, M.G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. **Cell.** 57:717-723. 1989.
- [22] LAVITRANO, M.; FORNI, M.; BACCI, M.L.; 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.** 64:284-291. 2003.
- [23] LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; ZANI, M.; FRATI, L.; SPADAFORA, C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. **Mol. Reprod. Dev.** 31: 161-169. 1992.
- [24] LAVITRANO, M.; FRENCH, D., ZANI, M.; FRATI, L.; SPADAFORA, C. Uptake of Exogenous DNA by Mammalian Spermatozoa. Interaction Between Sperm Cells and Foreign DNA. In: **Biotechnology of cell regulation.** R. Verna. and Y. Nishizuka (Eds) Raven Press, New York. Pp 315-322. 1991.
- [25] LAVITRANO, M.; MAIONE, E.; FORTE, E.; FRANCOLINI, M.; SPERANDIO, S.; TESTI, R.; SPADAFORA, C. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: A role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. **Exp. Cell. Res.** 233:56-62. 1997.
- [26] LEE, J.W.; DINNYES, A.; YANG, X. Development of transgenic embryos following injection of freeze-fried sperm in pigs. **Theriogenol.** 59:305. 2003.
- [27] MOREIRA, P.N.; GIRALDO, P.; COZAR, P.; POZUETA, J.; JIMENEZ, A.; MONTOLIU, L.; GUTIERREZ-ADAN, A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. **Biol. Reprod.** 71:1943-1947. 2004.
- [28] MOREIRA, P.N.; PÉREZ-CRESPO, M.; RAMÍREZ, M.A.; POZUETA, J.; MONTOLIU, L.; GUTIERREZ-ADÁN, A. Effect of Transgene Concentration, Flanking Matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse Transgenesis Mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection. **Biol. Reprod.** 76:336-343. 2007.
- [29] PERRY, A.C.; WAKAYAMA, T.; KISHIKAWA, H.; KASAI, T.; OKABE, M.; TOYODA, Y.; YANAGIMACHI, R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. **Sci.** 284:1180-1183. 1999.
- [30] SELLÉS, E.; GADEA, J.; ROMAR, R.; MATÁS, C.; RUIZ, S. Analysis of *in vitro* fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. **Reprod. Dom. Anim.** 38:66-72. 2003.
- [31] SHALGI, R.; PHILLIPS, D.M. Mechanism of sperm entry in cycling hamsters. **J. Ultrastruct. Res.** 71:154-161. 1980.
- [32] SHIM, S.W.; KIM, Y.H.; JUN, S.H.; LIM, J.M.; CHUNG, H.M. Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenol.** 53: 521.2000.
- [33] SMITH, K.; SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. **Bioessays.** 27:551-562. 2005.
- [34] SPADAFORA, C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. **Bioessays.** 20:955-964. 1998.
- [35] WESTENDORF, P.; TREU, H.; LIEDICKE, A. Deep freezing of boar's sperma. VIII. Additional laboratory and insemination tests using the Hulsenberger pellet deep-freezing technic. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.** 82:393-395. 1975.
- [36] YANAGIMACHI, R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: **Fertilization and embryonic development *in vitro*.** L Mastroianni and JD Biggers (Eds). Plenum Press, New York 81. Pp.182. 1981.