

## EVALUACIÓN DE LA RECOMBINASA RECA SOBRE LA UNIÓN ESPERMATOZOIDE-ADN EXÓGENO EN LA TRANSGÉNESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES EN LA ESPECIE PORCINA

Evaluation of boar sperm-RecA:ssDNA complex interaction

F. A. García-Vázquez<sup>1\*</sup>, A. Gutiérrez- Adán<sup>2</sup>, J. Gadea<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, España. <sup>2</sup> Departamento de Reproducción Animal, INIA, Madrid, España.

\***Autor para correspondencia:** Francisco A. García-Vázquez, Teléfono: +34-868-88809; Fax: +34-868-884147. E-mail: [fagarcia@um.es](mailto:fagarcia@um.es)

### RESUMEN

La transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT) es un método de producción de animales transgénicos. Se basa en la capacidad que presentan los espermatozoides de unir ADN exógeno y transferir el transgén a los ovocitos. Por otro lado, la proteína recombinasa de origen bacteriano RecA protege las cadenas simples de ADN de la degradación, al crear una capa protectora. Este hecho da lugar a una mayor producción de embriones viables e integración del transgén en animales producidos mediante microinyección pronuclear e ICSI. El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad de transferencia de los complejos RecA:ssADN en espermatozoides de cerdo, así como la viabilidad de los mismos mediante citometría de flujo. En primer lugar, se recolectó el semen y se centrifugó para eliminar el plasma seminal. Se utilizó el plásmido EGFP que fue incubado con los espermatozoides a 16° C (grupo control). Para el grupo RecA, en primer lugar se desnaturalizó el ADN (95°C, 5 min) y seguidamente, se incubó con la proteína RecA en hielo durante 1h, transcurrido este tiempo estos complejos (RecA:ssADN) formados se incubaron con los espermatozoides a 16°C. La incubación en presencia de la recombinasa RecA supuso un aumento significativo del porcentaje de células unidas al ADN con respecto a espermatozoides intactos incubados únicamente con el gen EGFP (Control: 19.68±0.73% vs. RecA: 24.69±0.70%; p<0.01). Los resultados mostraron que para ambos grupos la unión se produce principalmente a células no viables (Control: 19.21±0.71% vs. RecA: 24.11±0.69%; p<0.01), y en una muy baja relación a espermatozoides viables (Control: 0.47±0.09% vs. RecA: 0.58±0.09%; p=0.40). Con este estudio hemos demostrado que los complejos RecA:ssADN interactúan con los espermatozoides porcinos en mayor proporción que para el caso de los espermatozoides únicamente incubados con el transgén, y para ambos casos esta asociación se produce principalmente a células no viables. Por lo

tanto se podría utilizar la SMGT combinada con técnicas de reproducción asistida como la ICSI para la obtención de embriones y lechones transgénicos.

**Palabras clave:** RecA, recombinasa, transgén, transgénesis, espermatozoide, porcino.

## ABSTRACT

Sperm mediated gene transfer (SMGT) is an interesting tool for animal transgenesis consisting on the use of sperm cells as a vector for transmitting exogenous DNA into eggs at the moment of fertilization. On the other hand, RecA, a bacterial recombinase, was shown to protect DNA from degradation by creating a protective coating during its binding to it and resulted in higher embryo survival and transgenic integration frequencies in mice produced by ICSI. The objective of this study was to investigate the capacity of transference of RecA:ssDNA complex by pig spermatozoa by measuring the sperm DNA-binding ability and viability by flow cytometry. Semen was recovered and centrifuged, discarding the seminal plasma. Linearized plasmid DNA was added to sperm and incubated at 16°C (control group). In RecA group, DNA was denatured (95°C, 5 min) and incubated with RecA on ice for 1h, then mixed with sperm. RecA group sperm significantly increased DNA-binding capacity compared to control group semen after 120 min (Control: 19.68±0.73% vs. RecA: 24.69±0.70%; p<0.01). Exogenous DNA bound mainly to spermatozoa with reduced viability in all the groups of spermatozoa evaluated (Control: 19.21±0.71% vs. RecA: 24.11±0.69%; p<0.01). In consequence, only a low percentage of living spermatozoa was bound to DNA (Control: 0.47±0.09% vs. RecA: 0.58±0.09%; p=0.40). In this study we have demonstrated that the complex RecA:ssDNA bind with the pig sperm in a higher relation than sperm incubated only with the transgene, and in both cases the binding is associated mainly with non-viable cells. Therefore, the SMGT technique could combines with assisted reproductive techniques such as ICSI to obtain embryos and transgenic piglets.

**Key words:** RecA, recombinase, transgene, transgenesis, spermatozoa, porcine.

## INTRODUCCIÓN

La transgénesis es una potente herramienta biotecnológica para la generación de animales modificados genéticamente con aplicaciones en diferentes áreas como la medicina veterinaria, biomedicina y agricultura. La microinyección pronuclear del ADN ha sido el método más utilizado para la generación de animales transgénicos, en especial en el ratón (Gordon 1981). Esta técnica, aunque efectiva, es poco eficiente, resultando en menos del 5% de animales transgénicos (Niemann y Kues 2000; Nakanishi y cols., 2002; Wall 2002). En 1989, Lavitrano et al. describen un nuevo método para la producción de animales transgénicos, denominado transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT). Este método esta basado en la habilidad intrínseca que presentan los espermatozoides de unir ADN exógeno y transferir el transgén a los ovocitos, e

integrarse en el genoma del nuevo embrión. Sin embargo, aunque la SMGT ha sido utilizada en diferentes especies, los resultados presentados hasta el momento son muy dispares (revisado por Smith y Spadafora 2005).

Desde su descubrimiento, la técnica de SMGT se ha combinado con diferentes metodologías para incrementar su eficiencia, como por ejemplo, el uso de técnicas como la electroporación o lipofección, o incluso la utilización de anticuerpos como nexo de unión entre los espermatozoides y el transgén (revisado por Smith y Spadafora, 2005). Otra reciente innovación ha sido el uso de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) en combinación con la técnica de SMGT. Esta técnica se ha denominado transgénesis mediada por ICSI (Perry y cols., 1999), y que ha sido aplicada con éxito en la especie porcina (Lai y cols., 2001; Kurome y cols., 2006; García-Vázquez 2008).

Las técnicas descritas anteriormente se han considerado como procesos pasivos de transgénesis. Para mejorar la eficiencia de este método, se ha propuesto la transgénesis activa (Shinohara y cols., 2007), la cual consiste en inyectar recombinasas o transposasas en los ovocitos para incrementar la eficiencia de la integración del transgén en el genoma. En ratón la recombinasa bacteriana RecA (Kaneko y cols., 2006) y la proteína transposasa Tn5 (Suganuma y cols., 2005) han incrementado la eficiencia de la microinyección pronuclear y la transgénesis mediada por ICSI.

La proteína recombinasa A (RecA) procedente de *E. Coli* es una de las recombinasas mejor caracterizadas y juega un papel importante en la recombinación homóloga y en la reparación del ADN (Kowalczykowski y Egglestone 1994; Shinohara y Ogawa 1995). Este proceso se inicia mediante la unión de cadenas simples de ADN (ssADN) formando un filamento helicoidal nucleoproteínico. RecA también se ha mostrado como protectora de las cadenas ssADN de la degradación (Chow y cols., 1986), sugiriendo una estabilidad durante la microinyección pronuclear con los complejos RecA: ssADN durante la transgénesis en porcino y caprino (Maga 2001; Maga y cols., 2003); así como, una mayor supervivencia de embriones con el gen integrado.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar por citometría de flujo la unión y la viabilidad de espermatozoides coincubados con ADN exógeno (control) o con los complejos RecA: ssADN (RecA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

El semen utilizado provino de verracos de fertilidad comprobada pertenecientes al centro de inseminación artificial de la granja "Lo Navarro" S.A. (Murcia, España). Los animales estuvieron alojados en habitáculos individuales

mantenidos a temperatura controlada (25°C) y bajo condiciones naturales de luz y humedad. Los programas sanitarios y nutricionales, aplicados a los verracos, fueron los utilizados sistemáticamente en la granja.

### Medio utilizado para el procesado espermático

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). El medio utilizado para la dilución y lavado de los espermatozoides fue el *Swine Fertilisation Medium* (SFM) descrito previamente por Lavitrano y cols. (2003). 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), Trizma (6,5 gr/l). Posteriormente fue suplementado con 6 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA) para inducir el proceso de capacitación temprano ya que según Lavitrano y cols. (2003), es el momento óptimo donde se produce la unión entre el espermatozoide y el ADN exógeno. El pH final del medio fue ajustado a 6,8 (Lavitrano, comunicación personal).

### Plásmido EGFP

La proteína verde fluorescente GFP es una proteína que proviene de *Aequorea Victoria* que da lugar a fluorescencia verde cuando es expuesta a luz azul (395-470 nm). La variante mutada verde EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) es la forma mutada más utilizada (Furtado y Henry 2002, Nakanishi y cols., 2002, Kuser y Randall 2003). Esta variante tiene una intensidad de fluorescencia de 20 a 35 veces superior respecto del tipo salvaje de GFP (Hadjantonakis y cols., 2001), y es la que hemos utilizado en nuestro experimento.

El plásmido EGFP, que hemos utilizado en este trabajo, contiene el promotor temprano CMV (citomegalovirus) humano y fue obtenido de Clontech (pEGFP-N1, 5.7 Kpb, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA,

EE.UU). El plásmido se hizo lineal mediante el uso de AfIII. Finalmente el plásmido lineal fue marcado con fluoresceína-12-dUTP (Roche®, Alemania). La incorporación del nucleótido marcado en el ADN sintetizado disminuye su movilidad electroforética con respecto al ADN no marcado (Gutiérrez-Adán y Pintado 2000).

### **Recogida del semen y procesamiento de espermatozoides**

La obtención del semen se realizó mediante el método manual (King y Macpherson 1973). La primera fracción del eyaculado (concentración baja de espermatozoides) fue eliminada, y la fracción rica en espermatozoides fue recogida en un termo estéril precalentado a 37°C (para evitar el choque térmico) 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. (2003). 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 a 37°C. El tiempo transcurrido desde su recolección hasta la llegada al laboratorio no superó, en ningún caso, los 30 min. Una vez en el laboratorio, se diluyó de nuevo en medio SFM (37°C) en una proporción de 5 ml semen (1:1) en 45 ml de medio en tubos Falcon®, y se centrifugó a 800xg durante 10 min a 25°C.

Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en SFM (en este caso con BSA) a 25°C, de nuevo se centrifugó a 800xg durante 10 min a 25°C; se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml del medio con BSA a 25°C. Una vez acabado el procesamiento de los espermatozoides se valoró la motilidad mediante la observación en microscopio óptico

a 100 aumentos. Para ello, se depositaron 10 µl de la muestra sobre un portaobjetos precalentado en una placa térmica a 38°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido en una escala de 0 a 5 (Gadea y cols., 1998). Las muestras que no presentaban una motilidad superior al 65%, y una motilidad progresiva no inferior a 2,5 fueron descartadas del estudio. Se calculó la concentración final mediante un sistema espectrofotométrico (SpermaCue®, Minitub).

### **Preparación de los complejos RecA:ssADN**

Los complejos RecA:ssADN fueron preparados tal y como describieron Kaneko y cols., (2006). La preparación de la mezcla de ADN + RecA se inició mediante la retirada del 50% del glicerol, en el cual RecA (Epicentro, Madison, WI, EE.UU) fue transportado, por la filtración de gel a través de una columna de Microspin G-25 (Amersham, Poco Chalfong, Reino Unido) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Seguidamente, la columna fue lavada colocando 70 µl de 1x TKM tampón (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) en el centro de la columna y centrifugada a 735xg x 1 min a 4°C. Este paso de la centrifugación fue repetido dos o más veces desechando el 95% del flujo creado. A continuación, 35 µl de RecA se mezclaron con 35 µl de 2x TKM buffer, colocado en el centro de la columna y centrifugado durante 2 min a 4°C. RecA diluido al 50%, libre del glicerol, fue agregado a la mezcla de ADN en un volumen total de 20 µl. Para desnaturalizar el ADN y así cubrir la cadena simple de ADN con RecA, el ADN fue incubado a 95°C durante 5 min en el tampón 1x TKM. La concentración final de ADN fue 10 ng/µl, manteniendo la proporción 1:40 (ADN:proteína) para cubrir el total de las cadenas de ADN. La muestra fue enfriada en hielo durante 1 h y posteriormente incubada con el semen fresco.

## Evaluación de la unión espermatozoide-ADN y viabilidad espermática mediante citometría de flujo

El análisis de la unión espermatozoide-ADN y viabilidad espermática fue realizado mediante un citómetro Coulter Epics XL (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA). Los datos medidos por el citómetro fueron analizados usando el programa Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.).

Inicialmente se hizo una selección primaria basada en el tamaño y complejidad de la superficie celular para excluir partículas contaminantes, aglutinaciones, células somáticas, etc. De manera que se seleccionaron sólo las partículas con un tamaño y complejidad de la superficie compatible con las células espermáticas. La intensidad de fluorescencia que presentaban los espermatozoides fue analizada mediante el registro de fluorescencia verde (FL1), recogido a través de un filtro de 525 nm, mientras que el registro de fluorescencia roja (FL3) se realizó a través de un filtro de 575 nm.

Para realizar diversos estudios de la unión al ADN y simultáneamente evaluar la viabilidad celular fue necesario el empleo de dos fluorocromos. Los espermatozoides fueron incubados con EGFP marcado con fluoresceína y al mismo tiempo con Ioduro de Propidio (9.6 µl IP de la solución stock 500 µg/ml, por cada ml de muestra). Posteriormente, fueron medidos mediante el citómetro de flujo. Al utilizar conjuntamente dos fluorocromos es posible distinguir 4 subpoblaciones: 1) Espermatozoides vivos sin ADN unido (ningún signo de fluorescencia), 2) Espermatozoides vivos con ADN unido (fluorescencia verde), 3) Espermatozoides muertos con ADN unido (fluorescencia verde y roja) y 4) Espermatozoides muertos sin ADN unido (fluorescencia roja).

### Diseño experimental

Para ésta experiencia se utilizaron espermatozoides frescos (control) incubados con ADN

exógeno y espermatozoides frescos incubados con los complejos RecA:ssADN exógeno. El plásmido utilizado fue el transgén EGFP marcado con fluoresceína en la relación 10<sup>8</sup> células espermáticas/ml y 5 µg de ADN exógeno/ml (solución stock del plásmido EGFP 200 ng/µl) mantenidos a 16° C durante la incubación y el análisis posterior. A su vez se valoró la viabilidad espermática mediante la tinción con IP. Se analizaron, mediante el citómetro de flujo, 10.000 células espermáticas por grupo y 3 mediciones por muestra a lo largo del tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min), a una velocidad de 500 células/segundo. Para cada medición se tomaron 100 µl de muestra a los que se le añadieron 3 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline). Se realizaron un total de 5 replicados para esta experiencia y un total de 5 machos diferentes.

### Análisis estadístico

Se muestran los valores medios y el error estándar de la media de los parámetros estudiados. Se realizó un estudio de ANOVA considerando como efectos fijos el tipo de espermatozoide empleado y el tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min). Se consideraron diferencias significativas cuando P<0.05. Se utilizó el programa *Systat v11* (Systat Software Inc., 2004, Richmond, CA 94804, USA).

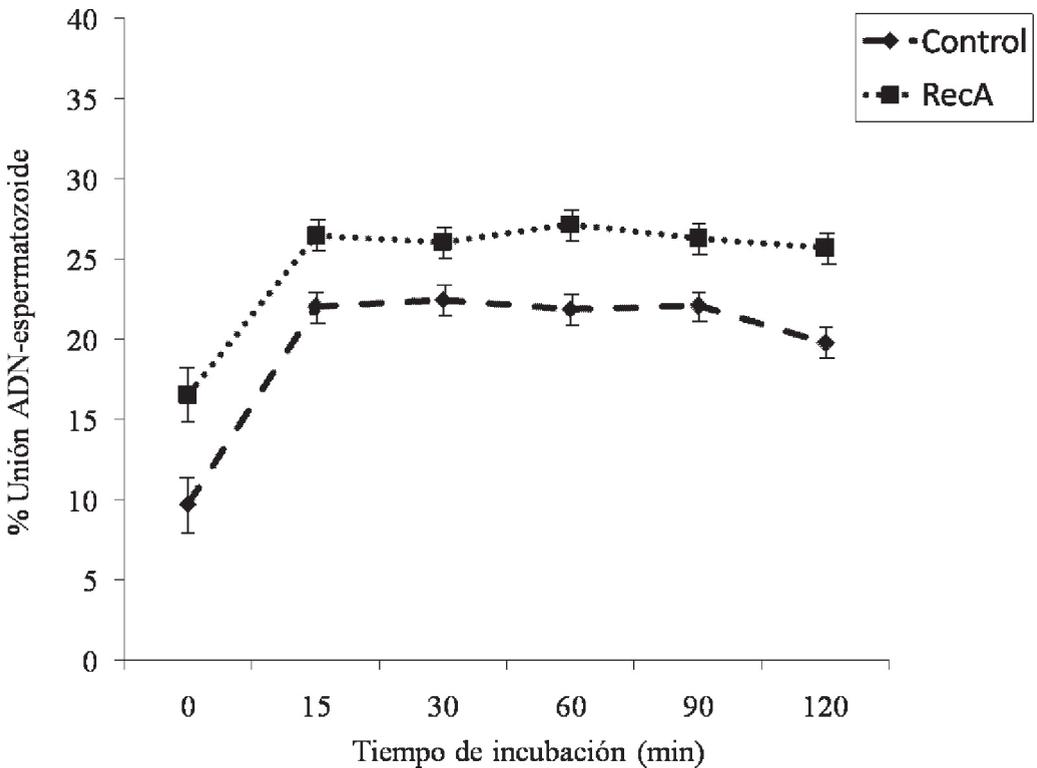
### RESULTADOS

La incubación en presencia de la recombinasa RecA supuso, en valores medios (media de los diferentes tiempos de incubación), un aumento significativo del porcentaje de células unidas al ADN con respecto a espermatozoides frescos incubados únicamente con el plásmido EGFP (24.69±0.70% vs. 19.68±0.73%, respectivamente; p<0.01). Los resultados se muestran en la tabla 1. Al evaluar las diferencias de unión total entre los grupos en los diferentes tiempos de incubación, observamos que para todos los

**Tabla 1.** Datos medios de unión y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación para espermatozoides incubados a su vez con los complejos RecA:ssADN [% Espz no viables: % espz IP+; %Unión total: % espz fluoresceína+ (F+); % Unión espz muertos: % espz F+, IP+; % Unión espz vivos: % espz F+, IP-]

Tratamiento	% Espz no viables	% Espz unidos		
		Total	Muertos	Vivos
Control	22.48±0.63 <sup>a</sup>	19.68±0.73 <sup>a</sup>	19.21±0.71 <sup>a</sup>	0.47±0.09
RecA	26.60±0.46 <sup>b</sup>	24.69±0.70 <sup>b</sup>	24.11±0.69 <sup>b</sup>	0.58±0.09

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)



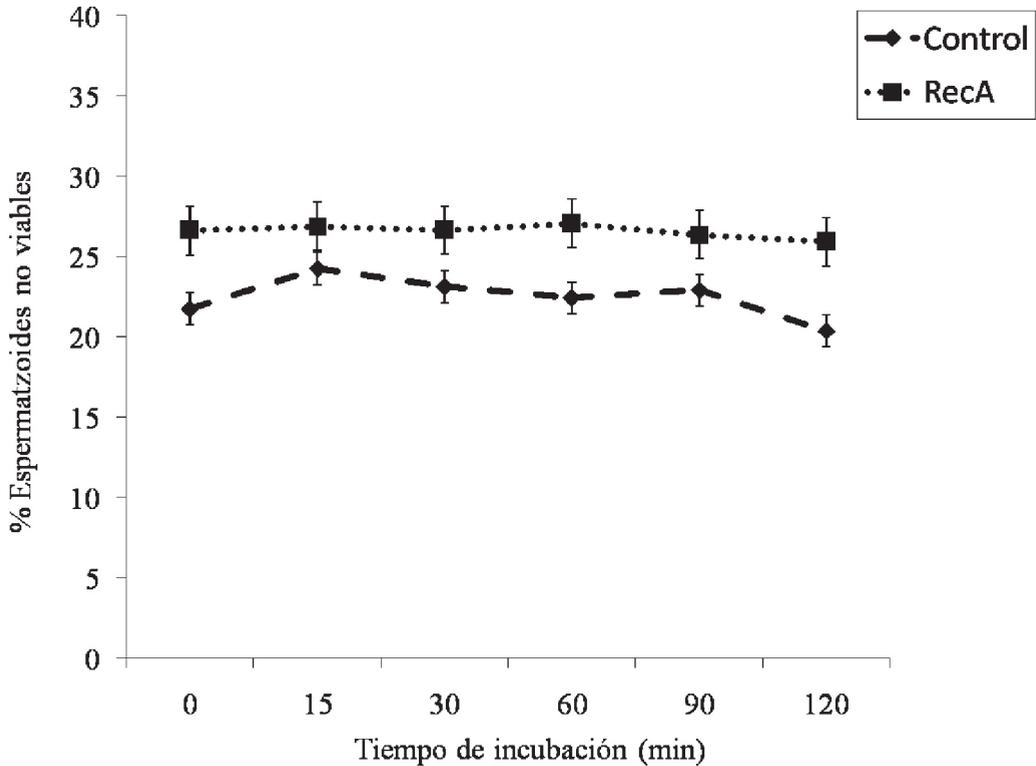
**Figura 1.** Cinética de unión entre el ADN exógeno y espermatozoides frescos incubados con ADN exógeno (control) o con los complejos RecA:ssADN (RecA) medidos a diferentes tiempos a lo largo de 120 min de incubación evaluados mediante citometría de flujo. Observamos que para ambos grupos en los primeros 15 min de incubación se produce el mayor % de unión.

**Tabla 2.** Datos de % de unión (unión total, unión a espermatozoides muertos y unión a espermatozoides vivos) y viabilidad a lo largo de 120 min de incubación (0, 15, 30, 60, 90, 120 min) para espermatozoides incubados con el ADN exógeno (grupo control) o con los complejos RecA: ssADN (grupo RecA) (% Espz no viables: % espz IP+; %Unión total: % espz F+; % Unión espz muertos: % espz F+, IP+; % Unión espz vivos: % espz F+, IP-).

	Tipo espermatozoide	Tiempo (min)						P
		0	15	30	60	90	120	
<b>Espz no viables</b>	<b>Control</b>	21.76±1.37 <sup>1</sup>	24.26±1.30	23.13±1.27	22.43±1.33 <sup>1</sup>	22.90±1.41	20.38±1.37 <sup>1</sup>	<b>P=0.48</b>
	<b>RecA</b>	26.62±1.50 <sup>2</sup>	26.90±1.42	26.65±1.39	27.06±1.45 <sup>2</sup>	26.37±1.54	25.92±1.55 <sup>2</sup>	<b>P=0.98</b>
<b>% Unión Total</b>	<b>Control</b>	9.75±2.23 <sup>a1</sup>	22.03±1.13 <sup>b1</sup>	22.48±1.23 <sup>b</sup>	21.87±1.31 <sup>b1</sup>	22.10±1.38 <sup>b1</sup>	19.80±1.32 <sup>b1</sup>	<b>P&lt;0.01</b>
	<b>RecA</b>	16.50±2.44 <sup>a2</sup>	26.44±1.24 <sup>b2</sup>	26.08±1.35 <sup>b</sup>	27.18±1.44 <sup>b2</sup>	26.27±1.51 <sup>b2</sup>	25.70±1.48 <sup>b2</sup>	<b>P&lt;0.01</b>
<b>% Unión espz muertos</b>	<b>Control</b>	8.69±2.04 <sup>a1</sup>	21.70±1.10 <sup>b1</sup>	22.04±1.19 <sup>b1</sup>	21.58±1.29 <sup>b1</sup>	21.79±1.36 <sup>b</sup>	19.43±1.31 <sup>b</sup>	<b>P&lt;0.01</b>
	<b>RecA</b>	15.78±2.23 <sup>a2</sup>	26.04±1.21 <sup>b2</sup>	25.73±1.31 <sup>b2</sup>	26.39±1.41 <sup>b2</sup>	25.60±1.49 <sup>b</sup>	25.16±1.47 <sup>b</sup>	<b>P&lt;0.01</b>
<b>% Unión espz vivos</b>	<b>Control</b>	1.05±0.39	0.33±0.11	0.44±0.12	0.28±0.19	0.31±0.18	0.36±0.14	<b>P=0.12</b>
	<b>RecA</b>	0.72±0.42	0.39±0.13	0.35±0.13	0.78±0.21	0.67±0.19	0.53±0.16	<b>P=0.77</b>

<sup>1,2</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre tipo de tratamiento (control y RecA).

<sup>a, b</sup> en la misma fila indican diferencias significativas (P<0.05) asociados al tiempo de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min).



**Figura 2.** Porcentaje de espermatozoides no viables (teñidos con yoduro de propidio) procedentes del grupo control (espermatozoides frescos incubados con ADN exógeno) y del grupo RecA (espermatozoides incubados con los complejos RecA:ssADN) medidos mediante citometría de flujo en diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min).

tiempos excepto para 30 min, el grupo RecA incrementó significativamente la unión espermatozoide-ADN (Control:  $22.48 \pm 1.23\%$  vs. RecA:  $26.08 \pm 1.35\%$ ;  $p=0.057$ ) (Tabla 2) (Figura 1). Para cada uno de los grupos observamos que tanto para el grupo control como para el grupo RecA la unión fue significativamente menor en el tiempo 0 en relación a los demás tiempos de incubación ( $p<0.01$ ) (Tabla 2), y dicha unión se produjo principalmente a células no viables en ambos grupos (Control:  $19.21 \pm 0.71\%$  vs. RecA:  $24.11 \pm 0.69\%$ ;  $p<0.01$ ), y en una muy baja relación a espermatozoides viables del total de los espermatozoides unidos (Control:  $0.47 \pm 0.09\%$  vs. RecA:  $0.58 \pm 0.09\%$ ;  $p=0.40$ ) (Tabla 1 y 2).

Por otro lado, al evaluar la viabilidad espermática a lo largo del tiempo observamos que no existieron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación para un mismo grupo (Control:  $p=0.48$ ; RecA:  $p=0.98$ ), y únicamente se observaron diferencias entre los grupos experimentales para los tiempos 0 y 120 min, donde el grupo RecA presentaba un mayor número de espermatozoides no viables que el grupo control (tiempo 0:  $p=0.02$ ; tiempo 120:  $p<0.01$ ) (Tabla 2). Evaluando los datos medios de viabilidad (media de los diferentes tiempos de incubación), los resultados indican que la incubación de los espermatozoides con los complejos RecA:ssADN supuso un aumento significativo

del porcentaje de células muertas ( $22.48 \pm 0.63\%$  vs.  $26.60 \pm 0.46\%$ ;  $p < 0.01$ ) (Tabla 1) (Figura 2).

## DISCUSIÓN

En diversos estudios realizados sobre el uso de la recombinasa RecA demuestran un aumento considerable en la producción de embriones transgénicos (Maga 2001; Maga y cols., 2003; Kaneko y cols., 2006). En nuestro estudio la incubación de los complejos RecA:ssADN con los espermatozoides supuso un aumento del porcentaje de células muertas y un aumento del porcentaje de células unidas al ADN, con respecto al grupo control. En estudios similares realizados por Moreira y cols., (2007), al incubar espermatozoides congelados-descongelados de ratón con complejos RecA:ssADN, encuentran que la mayoría de las células eran positivas con señal fluorescente en sus acrosomas, región post-acrosomal y estructuras en la pieza media. Mientras que cuando incuban espermatozoides de semen fresco únicamente con ADN, solamente encuentran la señal en los espermatozoides inmóviles, y cuando se incuban frescos y el complejo RecA:ssADN se marcan tanto los móviles como los inmóviles.

La citometría de flujo es una herramienta muy valiosa para evaluar la unión del ADN a los espermatozoides y la viabilidad de los mismos, a la vez que nos permite determinar la cinética del proceso de unión. Esta metodología ha sido validada con el microscopio de fluorescencia mediante observación directa (García-Vázquez 2008) y con el uso de imágenes multispectrales de citometría de Flujo (IMAGESTREAM®, Amnis) que es la combinación de análisis cuantitativos de imágenes y citometría de flujo (Gadea et al. datos no publicados).

En términos generales, se confirma el hecho de que la mayor parte de la unión de las moléculas de ADN y espermatozoides, se produce en células muertas o con alteraciones graves de la membrana. La hipótesis más verosímil es que la

alteración o fractura de la membrana espermática favorezca la interacción con el ADN y éste se una a la región perinuclear. No obstante, también es posible que la unión al ADN induzca la alteración y muerte del espermatozoide por la activación de las endonucleasas (Maione y cols., 1997). La muerte de la célula espermática podría ser un fenómeno natural para prevenir la transmisión de ADN exógeno a la siguiente generación (Anzar y Buhr 2006). Cuando las nucleasas son activadas por la presencia del ADN exógeno, catalizan la degradación localizada del ADN cromosómico del espermatozoide. La degradación del ADN y la modulación de la actividad de las nucleasas nos recuerdan a la muerte celular asociada al ADN descrita en las células somáticas (Spadafora 1998). Esa degradación del ADN podría disminuir la posibilidad de que los espermatozoides transporten el ADN exógeno en los procesos de fecundación (Kang y cols., 2008). En resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio hemos producido embriones porcinos viables mediante ICSI (datos no publicados) utilizando espermatozoides con graves alteraciones de membrana (sometidos a procesos de congelación-descongelación sin crioprotectores). Con estos datos, el siguiente paso es llevar a cabo la producción de embriones transgénicos usando la recombinasa RecA con el fin de evitar la degradación del ADN exógeno, aumentar la supervivencia embrionaria así como las tasas de transgénesis, tal y como han demostrado otros autores con la microinyección pronuclear (Maga 2001; Maga y cols., 2003).

En conclusión, hemos demostrado que los complejos RecA:ssADN interaccionan con los espermatozoides porcinos en mayor proporción que los espermatozoides únicamente incubados con el transgén, y para ambos casos esta asociación se produce principalmente a células no viables. Por lo tanto se podría utilizar la SMGT combinada con técnicas de reproducción asistida como la ICSI para la obtención de embriones y lechones transgénicos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos BIOCARM 10BIO2005/01-6463 y MEC-FEDER AGL2006-03495.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANZAR M., BUHR M.M. 2006. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology*. 65: 683-690.
- CHOW S.A., HONIGBERG S.M., BAINTON R.J., RADDING C.M. 1986. Patterns of nuclease protection during strand exchange. RecA protein forms heteroduplex DNA by binding to strands of the same polarity. *J. Biol. Chem.* 261: 6961-6971.
- FURTADO A., HENRY R. 2002. Measurement of green fluorescent protein concentration in single cells by image analysis. *Anal. Biochem.* 310: 84-92.
- GADEA J., MATÁS C., LUCAS X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 95-108.
- GARCÍA-VÁZQUEZ F. 2008. Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina: factores que afectan a la eficiencia de la técnica. Servicio de publicaciones Universidad de Murcia Base de Datos de Tesis Doctorales (TDR). ISBN: 978-84-691-1270-0.
- GORDON J.W., RUDDLE F.H. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. 214: 1244-1246.
- GUTIÉRREZ-ADÁN A., PINTADO B. 2000. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos. *Transgenic Res.* 9: 81-89.
- HADJANTONAKIS A.K., COX L.L., TAM P.P., NAGY A. 2001. An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta. *Genesis*. 29: 133-140.
- KANEKO T., MOISYADI S., SUGANUMA R., HOHN B., YANAGIMACHI R., PELCZAR P. 2006. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 64: 1704-1715.
- KANG J.H., HAKIMOV H., RUIZ A., FRIENDSHIP R.M., BUHR M., GOLOVAN S.P. 2008. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology*. 70: 1288-1296.
- KING G.J., MACPHERSON J.W. 1973. A comparison of two methods for boar semen collection. *J. Anim. Sci.* 36: 563-565.
- KOWALCZYKOWSKI S.C., EGGLESTON A.K. 1994. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 991-1043.
- KUROME M., UEDA H., TOMII R., NARUSE K., NAGASHIMA H. 2006. Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.* 15: 229-240.
- KUSSER K.L., RANDALL T.D. 2003. Simultaneous detection of EGFP and cell surface markers by fluorescence microscopy in lymphoid tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 5-14.
- LAI L., SUN Q., WU G., MURPHY C.N., KUHOLZER B., PARK K.W., BONK A.J., DAY B.N., PRATHER R.S. 2001. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes. *Zygote*. 9:339-346.
- LAVITRANO M., CAMAIONI A., FAZIO V.M., DOLCI S., FARACE M.G., SPADAFORA C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*. 57: 717-723.
- LAVITRANO M., FORNI M., BACCI M.L., DI

- STEFANO C., VARZI V., WANG H., SEREN E. 2003. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 284-291.
- MAIONE B., PITTOGGI C., ACHENE L., LORENZINI R., SPADAFORA C. 1997. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA. Cell. Biol.* 16: 1087-1097.
- MAGA E.A. 2001. The use of recombinase proteins to generate transgenic large animals. *Cloning Stem Cells.* 3: 233-241.
- MAGA E.A., SARGENT R.G., ZENG H, PATI S, ZARLING DA, OPPENHEIM SM, COLLETTE NM, MOYER AL, CONRADBRINK JS, ROWE JD, BONDURANT RH, ANDERSON GB, MURRAY JD. 2003. Increased efficiency of transgenic livestock production. *Transgenic Res.* 12: 485-496.
- MOREIRA P.N., PEREZ-CRESPO M., RAMIREZ M.A., POZUETA J., MONTOLIU L., GUTIERREZ-ADÁN A. 2007. 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.
- NAKANISHI T., KUROIWA A., YAMADA S., ISOTANI A., YAMASHITA A., TAIRAKA A., HAYASHI T., TAKAGI T., IKAWA M., MATSUDA Y., OKABE M. 2002. FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome. *Genomics.* 80: 564-574.
- NIEMANN H., KUES W.A. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim. Reprod. Sci.* 79: 91-317.
- PERRY A.C., WAKAYAMA T., KISHIKAWA H., KASAI T., OKABE M., TOYODA Y., YANAGIMACHI R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science.* 284: 1180-1183.
- SHINOHARA E.T., KAMINSKI J.M., SEGAL D.J., PELCZAR P., KOLHE R., RYAN T., COATES C.J., FRASER M.J., HANDLER A.M., YANAGIMACHI R., MOISYADI S. 2007. Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res.* 16: 333-339.
- SHINOHARA A., OGAWA T. 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends. Biochem. Sci.* 20: 387-391.
- SMITH K., SPADAFORA C. 2005. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays.* 27: 551-562.
- SPADAFORA C. 1998. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays.* 20: 955-964.
- SUGANUMA R., PELCZAR P., SPETZ J.F., HOHN B., YANAGIMACHI R., MOISYADI S. 2005. Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. *Biol. Reprod.* 73: 1157-1163.
- WALL R.J. 2002. New gene transfer methods. *Theriogenology.* 57: 189-201.

