RA1

**Avances recientes en micromanipulación y transgénesis en mamíferos domésticos y salvajes**

Daniel Felipe Salamone

Facultad de Agronomía (UBA) salamone@agro.uba.ar

Esta presentación describirá numerosos artículos en micromanipulación en gametos y embriones que hemos realizado en diferentes mamíferos domésticos y salvajes. En primer lugar, se describirá el proceso de clonación, ya que varias de sus fases, como la enucleación, la integración de células donantes y la activación, fueron modificadas en nuestro laboratorio (LAbBA). Hemos desarrollado nuevos protocolos que mejoran los resultados del procedimiento. Hoy en día, la clonación se realiza mediante trasplante nuclear. Usualmente usamos tres métodos diferentes. En uno de ellos, el ovocito está enucleado con la zona pelúcida (ZP), en el otro se usan métodos libres de ZP, pero en ambos protocolos la fusión de la célula donante se realiza por electroporación. El tercer método implica enucleación en presencia de ZP e inyección de una célula somática. Cada método tiene sus aplicaciones, por ejemplo, los embriones libres de zona pélucida permiten la agregación de embriones y la generación de descendientes clonados de más de una célula donante, con posibles beneficios para la viabilidad de la descendencia. Para llevar a cabo estos procedimientos, se utilizó un sistema de cultivo de microposos con numerosas ventajas que resultan en una alta tasa de preñez. En 2001-2002 por SCNT produjimos varios crias transgénicos clonados para una compañía farmaceutica. Algunos de ellos por reclonación. En 2002, en la Universidad de Massachusetts, exploramos la posibilidad de que las técnicas de transferencia nuclear sirvieran para mejorar la competencia de los ovocitos y, más recientemente, hemos estudiado en LabBA, el efecto de transferir uno o dos citoplasmas enucleados a zigotos para mejorar la competencia de embriones en el desarrollo. Los resultados obtenidos coinciden con los publicados recientemente en humanos por otros grupos e indican las enormes posibilidades de esta tecnología. Hemos realizado ICSI de varias especies incluyendo en algunos donde esta técnica había tenido serios problemas, como el bovino. Este enfoque nos ha permitido desarrollar un nuevo modelo para estudiar la falta de descondensación espermática y / o la activación embrionaria y tratar de resolverla. Por otra parte, se observó la posibilidad de producir embriones transgénicos con la técnica ICSI. Hemos demostrado en cinco especies domésticas que una construcción de ADN que contiene el gen de la proteína fluorescente verde (GFP), se puede introducir durante el procedimiento ICSI. Se introdujo ADN exógeno en el núcleo y se expresó el transgen. También se utilizaron varios métodos de marcación del embrión con GFP para desarrollar nuevas técnicas de micromanipulación. Uno de ellos consistió en la agregación de blastómeros de embriones de ocho células con dos embriones tetraploides y asincrónicos (con un estadio de desarrollo más bajo) observando que las células tetraploides producen principalmente trofoblasto. Este método nos permitirá introducir los precursores de las células de la placenta con poca participación en el embrión con las posibilidades prometedoras consecuentes de ser aplicadas para resolver ciertos problemas de placentación o para la transferencia de embriones heterospésicos. En otros experimentos, se observó que los espermatozoides se pueden clonar de manera eficiente. Esto permite la determinación del sexo en una copia antes de la fertilización de los ovocitos entre sí. También fue posible clonar los ovocitos para reconstruir los embriones. Estas dos últimas técnicas tienen un enorme potencial para seleccionar genomas haploides específicos libres de defectos y así evitar antes de la fecundación el consiguiente descarte de embriones. Además, recientemente hemos desarrollado una nueva técnica para transferir y multiplicar el número bajo de cromosomas por el trasplante de micronúcleos. Esto abre nuevas posibilidades para la micromanipulación de cromosomas individuales, por ejemplo, para cambios en el sexo de las células donantes o embriones producidos por SCNT. Por último, se utilizó una técnica de microinyección intracitoplásmica para la edición de genes utilizando un sistema CRISPR / CAS en bovinos PRNP genes se eliminó para proporcionar resistencia a la encefalopatía espongiforme bovina (enfermedad de la vaca loca) Utilizamos CRISPR / Cas9 sistema es eficiente no sólo para eliminar sino también Para insertar un gen por recombinación homóloga en líneas de células bovinas y embriones (cortar y pegar), abriendo nuevos horizontes para la ingeniería genética de animales grandes.

**Recent advances in micromanipulation and transgénesis in domestic and wild mammals**

 Daniel Felipe Salamone

 This presentation will describe numerous articles in micromanipulation in both gametes and embryos that we have made in different domestic and wild mammals. Firstly, the cloning process will be described, since several of its phases such as enucleation, donor cell integration and activation, were modified in our laboratory (LAbBA). We have developed new protocols that improve the results of the procedure. Today, cloning is done by nuclear transplantation. We usually use three different methods. In one of them, the oocyte is enucleated with the pellucid zone (ZP), in the other we use a ZP free methods, but in both protocols the fusion of the donor cell is performed by electroporation. The third method involves enucleation in the presence of ZP and injection of a somatic cell.  Each method has its applications, for example, pellucid zone-free embryos allow embryo aggregation and generation of cloned offspring from more than one donor cell, with potential benefits for the viability of offspring. To perform these procedures, a microwell culture system was used with numerous advantages that result in a high pregnancy rate. In 2001-2002 by SCNT we produced several cloned transgecnic aninals  for a farmaceutical company. Some of then by recloning.

In 2002, at the University of Massachusetts, we explored the possibility that nuclear transfer techniques would serve to improve oocyte competence and more recently, we have studied in LabBA, the effect of transferring one or two enucleated cytoplasms to zygotes to improve the competence in embryonic development. The results obtained are in agreement with those recently published in humans by other groups and indicate the enormous possibilities of this technology. We have performed ICSI of several species including in some where this technique had had serious problems, such as the bovine. This approach has allowed us to develop a new model to study the lack of spermatic decondensation and/or embryonic activation and try to solve it. On the other hand, the possibility of producing transgenic embryos with the ICSI technique was observed. We have demonstrated in five domestic species that a DNA construct containing the green fluorescent protein (GFP) gene, can be introduced during the ICSI procedure. Exogenous DNA was introduced into the nucleus and the transgen was expressed.
We also used several methods of labeling the embryo with GFP to develop new micromanipulation techniques. One of them consisted of the aggregation of blastomers of eight-cell embryos with two tetraploid and asynchronous embryos (with a lower stage of development) observing that the tetraploid cells produce mainly trophoblast. This method will allow us to introduce the precursors of placental cells with little participation in the embryo with the consequent promising possibilities to be applied to solve certain placentation problems or for heterospesific embryo transfer. In other experiments, it was observed that spermatozoa can be cloned efficiently. This allows the determination of sex in one copy before fertilizing oocytes with each other. It was also possible to clone the oocytes to reconstruct embryos. These last two techniques have an enormous potential to select specific haploid genomes free of defects and thus avoid prior to fertilization the consequent discard of embryos. Also, we have recently developed a new technique for transferring and multiplying low number of chromosomes by micronucleus transplantation. This open new possibilities for micromanipulating of individual chromosomes for example for sex changes of donor cells or embryos produced by SCNT. Finally, we used an intracytoplasmic microinjection technique for gene editing using a CRISPR/CAS system in cattle PRNP genes was eliminate to provide resistance to bovine spongiform encephalopathy (mad cow disease disease) We used CRISPR/Cas9 system is efficient not just to delete but also to insert a gen by Homologous recombiantion in bovine cell lines and embryos (cut and paste), opening new horizons for genetic engineering of large animals.