

## PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PORCINOS KNOCK-OUT PARA GENES ASOCIADOS AL XENOTRASPANTE (GGTA, B4GAL, CMAH Y GHR) MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE OVOCITOS

Piñeiro-Silva<sup>1,2</sup>, C., Fernández-Martín<sup>1</sup>, I., Navarro-Serna<sup>1,2</sup>, S. y Gadea<sup>1,2\*</sup>, J.

<sup>1</sup>Dept. Fisiología. Universidad de Murcia. Murcia 30.100. <sup>2</sup>IMIB-Arrixaca, Murcia

\*jgadea@um.es

### INTRODUCCIÓN

La producción de cerdos modificados genéticamente tiene numerosas aplicaciones tanto en el campo biomédico como agrario. Hay varios métodos de generación: la clonación, que permite una modificación genética más compleja y precisa, y la modificación de ovocitos/embriones (microinyección o electroporación), más sencilla y rápida (Navarro-Serna *et al.*, 2022a). Existe la necesidad de optimizar la técnica de electroporación para realizar múltiples modificaciones en embriones porcinos, ya que la demanda de estos está aumentando, sobre todo en el campo de los xenotrasplantes, donde son necesarias diversas modificaciones simultáneas de genes relacionados con la reacción inmunitaria hipergada y con el tamaño de los órganos (Tanihara *et al.*, 2021; Hinrichs *et al.*, 2020). Por todo esto, el objetivo de este trabajo es generar mediante electroporación embriones porcinos knock-out para los cuatro genes GGTA, CMAH, B4GALNT2 y GHR.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñaron guías para los cuatro genes objetivo y un pseudogen encontrado para B4GALNT2 (pseudogen B4GALNT2) utilizando el programa informático Breaking-Cas (Oliveiros *et al.*, 2016). Los complejos cúmulus-ovocito (COCs) fueron obtenidos de ovarios de cerdas prepúberes y madurados *in vitro* en medio NCSU-37 suplementado con FGF2, LIF e IGF1 (40, 20 y 20 ng/ml). Tras 42 h, los COCs fueron desnudados. Se llevó a cabo la electroporación de los ovocitos (50 ng/ l Cas9 y 25 ng/ l sgRNA) de la forma descrita anteriormente (Navarro-Serna *et al.*, 2022), manteniendo un grupo sin electroporar (control). Los ovocitos fueron inseminados en medio TALP como fue descrito anteriormente (Navarro-Serna *et al.*, 2022b). Los presuntos cigotos se cultivaron en medio NCSU23 (Cánovas *et al.*, 2017). El día 2 post-inseminación (pi) se evaluó la tasa de primera división embrionaria (%Div) y a día 6 pi la tasa de formación de blastocistos (%Blast). Los blastocistos fueron congelados de forma individual y la tasa de mutación (%Mut) y mosaicismo (%Mos) para cada uno de los genes fue evaluada mediante electroforesis capilar o secuenciación Sanger.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El %Div fue significativamente mayor en el grupo electroporado frente al control (72,13 % vs. 46,14 %), resultados vistos previamente en ovocitos electroporados debido a la activación de los ovocitos por el pulso eléctrico (Piñeiro-Silva *et al.*, 2023). El %Blast fue similar en el grupo control y electroporado (13,43 % vs. 11,59 %), por lo que el procedimiento no afecta al desarrollo embrionario. El %Mut fue en todos los casos superiores al 85 % excepto para el gen CMAH (51,39 %). El %Mos fue mayor del 70 % en todos los casos, excepto para el gen B4GALNT2 (44,70 %). La media de genes mutados por embrión fue de 4. La tasa de mutación total alcanzó el 34,29 % de los embriones, presentando mutación en los cinco genes objetivo.

### CONCLUSIÓN

Hemos conseguido producir embriones knock-out para los genes GGTA, CMAH, B4GALNT2 y GHR simultáneamente mediante electroporación de ovocitos con una eficacia suficiente para iniciar las transferencias embrionarias de los embriones generados a cerdas receptoras.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Cánovas, S., *et al.* 2017. *ELife*. 6: e23670. • Hinrichs, A. *et al.* 2020. *Xenotransplantation*. e12664 • Navarro-Serna, S. *et al.* 2022a. *Sustainable Agriculture Reviews* 57 • Navarro-Serna, S. *et al.* 2022b. *Int J Mol Sci*. 23(4): 2135 • Oliveiros, J.C. *et al.* 2016. *Nucleic Acids Res*. 14(W1): W267-W271 • Piñeiro-Silva, C. *et al.* 2023. *Animals*. 13(3):342. • Tanihara, F. *et al.* 2021. *Int J Mol Sci*. 22(5): 2249.

**Agradecimientos:** Proyectos AES 2019 (DTS19/00061); Fundación Séneca 21666/PDC/21 y 22065/PI/22, MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y PID2020-113366RB-I00 y Contrato predoctoral Plan de Fomento de la Investigación de la Universidad de Murcia para 2022 (R-496/2022).