

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PORCINOS KNOCK-OUT PARA EL GEN *GBJ2* COMO MODELO DE SORDERA HUMANA ASOCIADA A CONEXINA 26

Piñeiro-Silva^{1,2}, C., García-Purriños³, F. y Gadea^{1,2*}, J.

¹Dept. Fisiología. Universidad de Murcia (UMU), Murcia, España; ²IMIB Arrixaca, Murcia, España;

³Hospital U. Los Arcos, San Javier, Murcia, España

*jgadea@um.es

INTRODUCCIÓN

La producción de cerdos modificados genéticamente tiene numerosas aplicaciones tanto en el campo biomédico como ganadero. Hay varios métodos de generación: la clonación, que permite una modificación genética más compleja y precisa, y la modificación de ovocitos/embriones, más sencilla y rápida (Navarro-Serna *et al.*, 2022a). En el campo biomédico, se están produciendo animales que puedan servir como modelos de enfermedades humanas. El gen *GBJ2* codifica para la Conexina 26, cuya deficiencia es la mayor causa de pérdida de oído en el mundo produciendo más del 50% de los casos de sordera no sindrómica (Kenneson *et al.*, 2002). La producción de un modelo porcino KO para *GBJ2* ayudaría al desarrollo de técnicas de diagnóstico y tratamientos. Por ello, el objetivo de este trabajo es la generación de embriones porcinos KO para *GBJ2* mediante electroporación de ovocitos. Esta técnica permite editar un gran número de ovocitos de manera rápida y eficiente, siendo una herramienta ideal para evaluar la capacidad de edición genética de las sondas diseñadas

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó una guía ARN para el gen *GBJ2* con el programa informático Breaking Cas (Oliveiros *et al.*, 2016). Los complejos cúmulus-ovocito fueron obtenidos de ovarios de cerdas prepúberes y madurados *in vitro* en medio PIG-IVM1-LYO (Embryocloud, Murcia) suplementado con FGF2, LIF e IGF1 (40, 20 y 20 ng/ml, respectivamente). Los ovocitos se electroporaron inmediatamente antes de la fecundación (FIV) con 3 concentraciones distintas de proteína Cas9 y guía (1x, 2x, 4x) como fue descrito anteriormente (Navarro-Serna *et al.*, 2022b) manteniendo un grupo control sin electroporar. Tras la FIV, los presuntos cigotos se cultivaron hasta día 6 post-inseminación (pi) en medio PIG-IVC-lyo (Embryocloud, Murcia). El día 2 pi se evaluó la tasa de primera división embrionaria y a día 6 pi la tasa de formación de blastocistos. Los blastocistos fueron congelados de forma individual y la tasa de mutación, mosaicismo, eficacia (blastocistos mutantes/ovocitos totales), mutación bialélica y número de alelos fueron evaluados mediante electroforesis capilar. Se realizó el análisis estadístico con el programa IBM SPSS versión 28.0 utilizando los test de Shapiro-Wilk y Krustal-Wallis ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de división fue significativamente mayor en los tres grupos electroporados en comparación con el control (1x:66,7%, 2x:62,7%, 4x:66,3% vs. 50,7%; $p < 0,05$), resultados ya vistos anteriormente y debido a la activación ovocitaria por el pulso eléctrico (Piñeiro-Silva *et al.*, 2024). La tasa de blastocistos fue menor en los grupos x2 y x4 en comparación con el control (18,7% y 16,9% vs. 27,8%; $p < 0,05$), siendo el grupo x1 (24,1%) similar al control, lo que sugiere toxicidad de los reactivos a altas concentraciones. La tasa de mutación fue similar para los tres grupos y superior al 70,6% (70,6-88,5%), al igual que el mosaicismo (79,2-95,7%) y la eficacia (13,9-17,0%). El número de alelos fue mayor en el grupo 4x que en el 1x (3,65 vs. 3,13; $p < 0,05$). La tasa de mutación bialélica fue de 0 en los grupos x1 y x2, mientras que de 13,0% en el grupo 4x. El grupo 4x es el que presenta mejores tasas de mutación bialélica, a iguales tasas de mosaicismo y eficiencia.

CONCLUSIÓN

Hemos conseguido producir embriones *GBJ2*-KO mediante electroporación de ovocitos con elevadas tasas de mutación, aunque se abre un reto para mejorar en la tasa de mosaicismo y la de mutación bialélica, ya que podría suponer un problema a la hora de la generación de animales editados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kenneson, A. *et al.* 2002. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. 4: 258-74
- Navarro-Serna, S. *et al.* 2022a. Generation of gene edited pigs. 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.* 2024. Theriogenology. 218:126-136.

Agradecimientos: "Fundación Seneca" 22065/PI/22 y 22545/PDC/24; ID2020-113366RB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y Contrato predoctoral UMU 2022 (R-496/2022).