

# Vitrificación de embriones pre-implantatorios como método simple para la protección y generación de ratones transgénicos



<https://cu-id.com/2248/v46e13>

## Vitrification of pre-implantation embryos a simple method for the preservation and production of transgenic mice

✉ Boris Ramos Serrano<sup>1</sup>, ✉ Alejandro Ramos Hernández<sup>2</sup>, ✉ Yadiel López García<sup>3</sup>,  
✉ José Luis Rodríguez-Suastegui<sup>1</sup>, ✉ José Ernesto Hernández-Pichardo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Laboratorio de Manejo de la Reproducción Animal. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, CP. 04960, CDMX, México.

<sup>2</sup>Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Departamento de Biomodelos Experimentales. Calle 3ra No 40759 entre 6ta y Carretera Tirabeque, Reparto La Unión, Boyeros, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT). Departamento de Fertilización *in vitro*. Avenida 101, No. 6214 entre 100 y 62. Loma de Tierra, Cotorro, La Habana. Cuba.

**RESUMEN:** La vitrificación de embriones y gametos es una novedosa alternativa para la protección *ex situ* y generación de ratones transgénicos. Un primer objetivo de este trabajo fue demostrar la efectividad de la vitrificación de embriones en 4-células con el propósito de conservar el genofondo de cuatro líneas de ratones transgénicos: 1) Ataxia, 2) Transferrina humana, 3) receptor *CD46* y 4) ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (PVF); un segundo objetivo, fue obtener crías transgénicas a partir de embriones pronucleares vitrificados y modificados genéticamente por lentitransgénesis. En ambos experimentos fueron utilizados como grupo control embriones obtenidos de ratones no transgénicos. Los embriones en los estadios 4-células y pronucleares fueron obtenidos a las 55 h y 18 h post tratamiento superovulatorio, en cada caso. Los embriones colectados fueron vitrificados en sus correspondientes mezclas de DMSO, etileno glicol y sucrosa, y conservados en nitrógeno líquido hasta su uso. Post descongelación fue evaluada la supervivencia *in vitro* e *in vivo* en cada grupo experimental y se determinaron los principales daños citoestructurales que sufrieron los embriones. En el primer grupo experimental, los embriones vitrificados en estadio de 4-células, se logró una alta tasa de supervivencia embrionaria post descongelación en las cuatro líneas transgénicas (rango 91,5% a 100%). En el caso del desarrollo *in vivo*, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de crías nacidas viables entre las líneas transgénicas Ataxia 49,5%, Transferrina 47%, Receptor *CD46* 24,4% vs control vitrificado 38,3% ( $p < 0,05$ ), respectivamente). Como principales daños citoestructurales se observó la ruptura de la zona pelúcida y lisis de blastómeros, con porcentajes que difieren entre grupos. En el caso de los embriones pronucleares se obtuvo una tasa de desarrollo *in vivo* de 19,9% de crías viables ( $n=52$  crías nacidas/ 266 embriones transferidos). De éstas un 25% de las crías obtenidas fueron transgénicas ( $n=13/52$ ), para una eficiencia general por lentitransgénesis utilizando embriones pronucleares vitrificados de 4,5% ( $n=13/266$ ). Los resultados obtenidos corroboran la efectividad de la vitrificación de embriones con fines de protección de genofondos y la generación de ratones modificados genéticamente por lentitransgénesis.

**Palabras clave:** vitrificación de embriones, ratones transgénicos, criobancos.

**ABSTRACT:** Vitrification of embryos and gametes is a novel alternative for *ex situ* preservation and production of transgenic mice. The first objective of this research was to demonstrate the effectiveness of vitrifying 4-cell embryos for the preservation of genetic lines from four transgenic mouse models: 1) Ataxia, 2) Human transferrin, 3) *CD46* receptor, and 4) transgenic mice expressing green fluorescent protein (GFP). A second objective was to produce transgenic offspring from vitrified pronuclear embryos that had been genetically modified via lentiviral transgenesis. The embryos obtained from non-transgenic mice served as the control group. Those embryos at the 4-cell and pronuclear stages were collected 55 hours and 18 hours, respectively, after superovulatory treatment. The embryos collected were vitrified using specific mixtures of DMSO, ethylene glycol and sucrose; and they were subsequently stored in liquid nitrogen until needed. *In vitro* and *in vivo* survival was evaluated in each experimental group, as well as the principal cytostructural damage suffered by the embryos after thawing. In the first experiment, a high embryonic survival rate was reached in all four transgenic lines after the vitrification of embryos at the 4-cell stage, ranging from 91,5 % to 100 %. In the case of *in vivo* development, no significant differences were observed in the percentages of viable offspring born among the transgenic lines Ataxia (49,5 %), Transferrin (47 %) and *CD46* receptor (24,4 %), compared to the vitrified control group (38,3 %) ( $p > 0,05$ ). The main cytostructural damages observed were the rupture of the zona pellucida and lysis of blastomeres, with percentages differing among groups. In the case of pronuclear embryos, a 19,9 % viable offspring rate was obtained ( $n=52$  live births/266 embryos transferred). Of these, 25 % ( $n=13/52$ ) of the offspring obtained were transgenic, resulting in an overall efficiency of 4,5 % ( $n=13/266$ ) for lentiviral transgenesis using vitrified pronuclear embryos. The results obtained demonstrate that embryo vitrification is an effective method for preserving mouse lines and producing transgenic mice through lentiviral transgenesis.

**Key words:** embryo vitrification, transgenic mice, mouse embryo cryobanking.

\*Correspondencia a: José Ernesto Hernández-Pichardo. E-mail: [ehernan@correo.xoc.uam.mx](mailto:ehernan@correo.xoc.uam.mx).

Recibido: 05/04/2024

Aceptado: 28/07/2024

## INTRODUCCIÓN

La criobiología es la ciencia que estudia la respuesta de las células vivas a los eventos físico-químicos de la congelación. Los principios de congelación han permitido la conservación de una gran diversidad de tejidos, células somáticas y reproductivas de numerosas especies del reino animal y vegetal (1, 2). Por esta vía es posible conservar indefinidamente los genofondos genéticos de las principales especies animales de interés productivo y científico. Particularmente, en el área de las investigaciones, la crioconservación de óvulos, espermatozoides, embriones y fragmentos de gónadas (3-5) han facilitado la protección de numerosos biomodelos experimentales, especialmente los ratones de laboratorio (*Mus musculus*) (6-8).

Con este propósito se han utilizado diferentes técnicas para la crioconservación de embriones preimplantatorios, técnicas que en su mayoría son de compleja ejecución y requieren equipamiento sofisticado (9, 10). Sin embargo, nuevos métodos de crioconservación sobresalen por su simple ejecución y bajos costos de implementación como la congelación ultrarrápida (11, 12) y la técnica de vitrificación (13, 14).

La vitrificación se ha empleado con una alta efectividad para la crioconservación de células y tejidos reproductivos (15, 16). En ratones se han obtenido crías viables a partir de la vitrificación de embriones en todos los estadios preimplantatorios (11, 17, 18). Generalmente son seleccionados estadios embrionarios avanzados para crioconservar genofondos, ya que estos cuentan con un mayor número de blastómeros y capacidad de supervivencia post descongelación (14, 19, 20). Sin embargo, dicha opción limita la implementación de otras biotecnologías reproductivas. Técnicas como la microinyección pronuclear para la generación de animales transgénicos (21-23), las técnicas de edición génica y la clonación somática (24), así como la obtención de células madres (25, 26), que requieren de estadios embrionarios tempranos para su implementación (27).

Por ello resulta de gran interés la vitrificación de embriones en estadios tempranos y crear reservas suficientes para usos posteriores. Desde el punto de vista práctico esta opción permitiría simplificar el número de pasos en un día de trabajo, también los operadores tendrían una mayor flexibilidad en los horarios para ejecutar las técnicas, y no menos importante, una reducción de animales por concepto de fallos experimentales. Sin dudas, el dominio de esta biotecnología incrementaría la efectividad de los técnicos de laboratorio y en consecuencia los resultados esperados serían superiores.

Teniendo en cuenta los elementos descritos, en el presente trabajo el primer objetivo fue demostrar la efectividad de la vitrificación de embriones en 4-células con el propósito de conservar el genofondo de

cuatro líneas de ratones transgénicos; y el segundo objetivo, fue obtener crías transgénicas a partir de embriones pronucleares vitrificados y modificados genéticamente por lentitransgénesis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de manejo y alojamiento de los ratones

Los ratones de las líneas transgénicos y no transgénicos fueron mantenidos bajo condiciones controladas (CENPALAB, La Habana, Cuba, 2007). Las hembras donantes de embriones se alojaron en cajas convencionales de polisulfonato PSU TIII (Modelo 1290D, Tecniplast) a razón de 10 hembras por caja ( $\approx 50 \text{ cm}^2/\text{animal}$ ), y los machos individualmente en cajas TII (Modelo 1264C, Tecniplast). Como encamado se utilizó el bagazo de caña de azúcar desmeollado manualmente (AZCUBA, Cuba). Fueron alimentados con concentrado suministrado a voluntad (Formulación EAO1004, CENPALAB, Cuba) y agua tratada. Sin excepción, todos los materiales en contacto con los animales fueron esterilizados por autoclave ( $121 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ ). Las salas de manejo poseen un ambiente controlado automáticamente, con una temperatura de  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , Humedad Relativa de 65% a 80% y un ciclo de 12 h luz.

### Donantes de embriones

Los embriones transgénicos en estadios 4-células fueron obtenidos del apareamiento de machos transgénicos homocigotos con hembras no transgénicas de la línea B6D2/F1Cenp, y como grupo control se utilizaron hembras y machos no transgénicos de la línea B6D2/F1Cenp. Fueron seleccionadas cuatro líneas transgénicas: *i*) Ataxia humana (SCA2) (28), *ii*) Transferrina humana (29), *iii*) Receptor CD46 humano (Biomodelo no publicado) y *iv*) ratones transgénicos expresando el gen reportero PVF (Biomodelo no publicado). En el caso de los embriones pronucleares se obtuvieron de hembras y machos no transgénicos de la línea B6D2/F1Cenp. Las hembras donantes se escogieron con una edad entre 4 y 5 semanas de edad, vírgenes y un peso corporal entre 14 g y 16 g. Para la superovulación se aplicó una dosis inicial de 10 UI/i.p. de PSMG (Folligon®, Intervet, Viena, Austria), seguido de una segunda inyección a las 48 horas de 5 UI/i.p. de hCG (Chorulon®, Intervet, Viena, Austria) e inmediatamente fueron apareadas con los machos fértiles. A la mañana siguiente se determinó el tapón vaginal, y fueron sacrificadas (inhalaación vapores de éter) según el estadio embrionario a colectar, a las 18 h ó 55 h post hCG en el caso de los embriones pronucleares y en 4-células, respectivamente. Los embriones fueron colectados por vía quirúrgica en ambos casos (30).

### **Cultivo *in vitro* de los embriones preimplantatorios de ratón**

El cultivo *in vitro* de los embriones se realizó por el sistema de microgotas (9 gotas/20  $\mu$ L) en placas Petri ( $\varnothing$  35 mm, Greiner bio-one) cubiertas con 2.5 mL de aceite mineral. Como medio de cultivo fue empleado el M-16 suplementado con 0.1 mM de EDTA, 1 mM de glutamina y 4 mg/mL de BSA. Una vez distribuidos los embriones en cada gota ( $n = 20$ ) fueron cultivados a 37 °C en una mezcla de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad relativa.

### **Método de vitrificación y desvitrificación para embriones en estadio de 4-células**

La solución de vitrificación (SV) consistió en una mezcla de 4,5 mol/L de DMSO y 0,25 mol/L de sucrosa disueltos en medio M-2 (11). Los embriones se depositaron en grupos de 10 a 20 en 1 mL de SV por 3 min, e inmediatamente fueron cargados en las pajuelas de congelación (Minitub, 0,25 mL) y sumergidos en el nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L). Para la desvitrificación, las pajuelas se extrajeron del N<sub>2</sub>L y se mantuvieron suspendidas en el aire 10 s, luego se introdujeron en un baño a 37 °C hasta su total descongelación. Seguido, el contenido de la pajuela se descargó en 1 mL de medio de descongelación (0,25 mol/L sucrosa) y se incubó en este por 15 min. Posteriormente, los embriones se lavaron tres veces en medio M-2, y se evaluó la integridad morfológica. El desarrollo *in vivo* se evaluó transfiriendo los embriones en hembras receptoras adultas de la línea B6D2/F1 ( $\geq 8$  semanas de edad), con un peso corporal mayor de 25 g y con 0,5 días poscoito de pseudogestación.

### **Método de vitrificación y desvitrificación para embriones pronucleares**

Se utilizaron dos soluciones de vitrificación, SV1 (2,68 mol/L etilenglicol, 0,6 mol/L DMSO) y SV2 (4,47 mol/L etilenglicol, 1,2 mol/L DMSO mol/L, 0,25 mol/L sucrosa), ambas soluciones fueron preparadas con medio M-2. Los embriones se vitrificaron en grupos de 20, primeramente, fueron incubados en la SV1 por 1 min; luego, incubados 30 s en la SV2 e inmediatamente, cargados en las pajuelas de congelación (Minitub, 0,25 mL) y sumergidos en el N<sub>2</sub>L. La desvitrificación se realizó en dos pasos, primero las pajuelas se extrajeron del N<sub>2</sub>L, se expusieron 5 s al aire y 10 s a 37 °C. Luego el contenido de la pajuela se descargó en 1 mL del primer medio de descongelación (0,25 mM sucrosa) y equilibró por 15 min. Se realizó un segundo lavado en medio con sucrosa al 0,125 mol/mL por 10 min. Finalmente, los embriones se lavaron tres veces en medio M-2 y se evaluó la viabilidad e integridad morfológica.

### **Producción del vector lentiviral (LvPVF) y microinyección de los embriones pronucleares en el espacio perivitelino**

Para la producción del vector lentiviral se utilizó el sistema de expresión comercializado por Invitrogen-Life Technologies (Cat. No. K49500-00) compuesto por la línea celular 293-FT y el sistema de vectores ViraPower™. Brevemente, las células 293-FT fueron sembradas a una densidad de  $1,7 \times 10^6$  células/frasco de cultivo (25 cm<sup>2</sup>, Greiner-bione), a las 18 h de cultivo la monocapa de células se transfectaron con los vectores lentivirales y mantuvieron en cultivo de 16 a 20 h. A las 48 h posterior a transfección del lentivirus recombinante, éste fue cosechado del sobrenadante, ultra centrifugado y separado en alícuotas hasta su microinyección en los embriones (31). La microinyección del vector lentiviral se realizó en el espacio perivitelino de los embriones pronucleares vitrificados o no vitrificados (grupo control). Para ello se utilizaron microagujas de cristal con puntas de 1-2  $\mu$ m de diámetro de grosor. Las microagujas fueron previamente cargadas con la solución que contenía el vector lentiviral (3-5  $\mu$ L), esta solución fue microinyectada en el espacio perivitelino a través de la zona pelúcida.

### **Técnica de transferencia de embriones por vía quirúrgica**

Las hembras receptoras fueron preanestesiadas con una combinación de diazepam/atropina (3:1, 100  $\mu$ L/i.p./animal), luego se les administró una segunda inyección (20  $\mu$ L/animal) de Ketamina (50 mg/mL/i.p.). Para acceder a la cavidad abdominal se realizó una incisión sobre la fosa del ijar izquierdo aproximadamente de 0,5 cm de largo, seccionando por plano de tejidos hasta llegar al interior de la cavidad. El ovario izquierdo junto con el oviducto y parte del cuerno uterino se extrajeron por el panículo adiposo. Identificado la entrada del infundíbulo y con la ayuda de pinzas de disección los embriones son depositados en la primera porción del infundíbulo. Finalizado este paso se reintrodujo el tracto reproductivo a la cavidad abdominal y la herida fue suturada por planos. Las hembras transferidas retornaron a su local de crianza y durante una semana se les aplicó tratamientos post operatorios y de analgesia.

### **Análisis estadísticos**

Para los análisis estadísticos fue utilizada la prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con un nivel de significación de  $p < 0,05$ , empleando el programa GraphPad Prism version 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de microcristales de hielo dando la apariencia de un cristal transparente (15), donde se alcanzan velocidades de congelación en un rango entre los 2000 a 20,000 °C/min; velocidad, que dependerá en gran medida del volumen de crioprotectores donde son congeladas las muestras biológicas (32). Esta tecnología ha tenido un impacto trascendental en la protección de miles de líneas de ratones generadas alrededor del mundo (6, 7, 33).

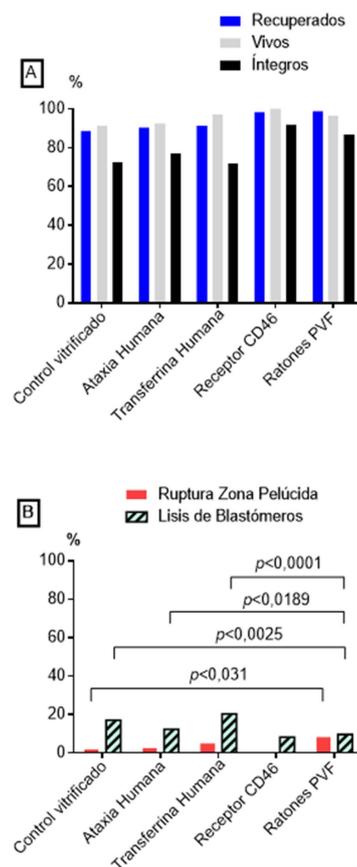
Para considerar un programa de conservación de genofondo o la producción de ratones transgénicos, es necesario obtener de forma regular suficientes embriones de alta calidad y en los estadios apropiados. En este trabajo, un alto porcentaje de las hembras respondieron al tratamiento superovulatorio, confirmando el apareamiento del 76,9% (n = 40/52) y 76,0% (n = 95/125) en las donantes de embriones en estadios 4-células y pronucleares, respectivamente. Considerando las cuatro líneas transgénicas, se obtuvo promedio 13 embriones (4-células) por hembra superovulada (n = 526 embriones/40 donantes) y en el caso de los embriones pronucleares fueron producidos un promedio de 10 embriones /hembra superovulada (n = 1005 embriones/95 donantes).

En el momento prefijado para el sacrificio de las hembras donantes (18 h y 55 h post hCG), el 87,7% (n = 1005/1146) y 87,5% (n = 526/601) de los embriones se encontraban en los estadios pronucleares y 4-células, respectivamente. Los porcentajes de fragmentación, en el caso de los embriones obtenidos en los estadios pronucleares no superaron el 7,4% (n = 85/1146), y en los embriones en estadio de 4-células el 5,1% (n = 31/601).

La superovulación de ratones, mediante la administración de las gonadotropinas PMSG y hCG, es una vía simple y económicamente viable, que permite obtener suficientes embriones y óvulos de alta calidad a partir de un reducido grupo de hembras (34). Sin embargo, la respuesta superovulatoria puede variar por múltiples factores, situación que exige que cada laboratorio ajuste los protocolos a utilizar (34, 35). En nuestras condiciones se observó que un alto porcentaje de las hembras superovuladas respondieron al tratamiento hormonal, y produjeron suficientes embriones por hembra. Si bien, la respuesta obtenida coincide con resultados de otros autores (34, 36), es deseable obtener respuestas superovulatorias superiores (37). Los resultados obtenidos sugieren que, en nuestras condiciones, sería necesario contar con un promedio de 30 a 50 hembras donantes, para obtener entre 300 y 500 embriones necesarios para proteger una línea de ratón.

Post descongelación de los embriones en 4-células se lograron altas tasas de recuperación (Figura 1A) con un valor de 88,6% en el grupo control vitrificado;

y valores de un 90,4%, 91,3%, 98,4% y 98,9%, en los transgénicos de ataxia humana, transferrina humana, receptor CD46 humano y ratones transgénicos PVF, respectivamente. El porcentaje de embriones vivos post descongelación superó en todos los casos el 90% de eficiencia (Figura 1A), y se observaron valores de integridad de 72,5%, 77 %, 71,9%, 91,9% y 86,8% para el grupo control vitrificado, y los transgénicos de ataxia humana, transferrina humana, receptor CD46 humano y PVF, respectivamente. En ninguno de los criterios evaluados se observaron diferencias significativas.



**Figura 1.** Principales daños mecánicos observados en los embriones en 4-células de ratón post descongelación: Eficiencia de recuperación (1A) y daños mecánicos (1B). Control Vitrificado (Embriones no transgénicos vitrificados). Prueba de Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ). / Mechanical damages observed in 4-cell mouse embryos post-thawing. Embryo recovery efficiency (1A) and mechanical damages (1B). Vitrified Control (Vitrified non-transgenic embryos). Chi-square test ( $p < 0,05$ ).

Como principales daños mecánicos post vitrificación, se consideraron la ruptura de la zona pelúcida y la lisis de blastómeros. En el primer caso, los porcentajes de ruptura de la zona pelúcida difieren significativamente sólo en el grupo de ratones transgénicos PVF y el grupo control vitrificado, 8,2% vs 1,9%, respectivamente ( $p < 0,0310$ ). En el caso de las lisis de blastómeros, fue significativamente superiores en los grupos de transferrina humana,

control vitrificado y ataxia humana en comparación con el grupo transgénico de PVF, de un 20,4% 17% 12,4% vs 1,6%, respectivamente (Figura 1B). Se conoce que la pérdida de blastómeros puede afectar la capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los embriones, sin embargo, los blastómeros de los embriones en 4-células tienen capacidad totipotente, y es posible obtener crías viables a partir de la transferencia de embriones con más de un 50% de blastómeros dañados (24).

En el caso del desarrollo *in vivo*, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de nacimientos de crías viables post transferencia entre los embriones vitrificados de las tres líneas transgénicas y el control vitrificado (Ataxia 49,5%, Transferrina 47%, Receptor CD46 24,4% y control vitrificado 38,3%, respectivamente) (Tabla 1). En nuestro caso fueron transferidos solamente embriones íntegros, lográndose altos porcentajes de nacimientos en todos los grupos estudiados. Además, se observa en todos los grupos una proporción de hembras y machos suficientes para iniciar un núcleo genético.

En el caso de la generación de crías transgénicas a partir de embriones pronucleares previamente vitrificados y microinyectados con el vector lentiviral, en la tabla 2 se observa que no hubo diferencias significativas en la supervivencia a la microinyección entre los grupos de embriones pronucleares vitrificados y no vitrificados (Control fresco), de 80,4% vs 71,6% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Sin embargo, post cultivo *in vitro* se observó un porcentaje significativamente mayor de embriones verdes fluorescentes en el grupo de embriones no vitrificados en comparación con los embriones vitrificados (44,7% vs 17,7%;  $p < 0,003$ ; Tabla 2).

Los embriones pronucleares son el estadio de preferencia para la introducción de fragmentos de

ADN recombinante en ratones (38). La obtención de este estadio embrionario requiere de una coordinación precisa, y sólo se cuenta con un lapso de tiempo muy breve para la visualización y microinyección de los pronúcleos. En términos prácticos para ejecutar una sesión de microinyección de embriones pronucleares se requiere de embriones frescos obtenidos a partir de las hembras superovuladas y, además es necesario preparar las hembras nodrizas que recibirán los embriones modificados. Un fallo en la respuesta de las hembras superovuladas cancelaría la sesión de microinyección y la pérdida de las hembras nodrizas. En términos de tiempo significarían dos semanas de trabajo perdidos. Por ello, resulta de gran interés práctico contar con una fuente alternativa de embriones pronucleares previamente criopreservados, que garantice una disponibilidad rápida y confiable de este estadio en caso necesario (11, 22).

La eficiencia de transgénesis microinyectando vectores lentivirales en embriones pronucleares frescos de ratón es variable, con porcentajes que pueden oscilar en un mismo laboratorio, entre un 2,9% a 85,7% (39) y de un 12,5% a 100% en la producción de crías transgénicas (40). En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas el desarrollo *in vivo* en ninguno de los criterios evaluados (Tabla 3), lográndose un 25% de ratones transgénicos por crías nacidas ( $n=13/52$ ), y un 4,9% de eficiencia general de transgénesis ( $n=13/266$ ).

Es importante mencionar que fue necesario transferir más de 20 embriones vitrificados y microinyectados con el vector lentiviral por nodriza para conseguir gestaciones a término, ya que un número inferior de embriones transferidos no se lograron obtener gestaciones y por consiguiente crías (Resultados no publicados).

**Tabla 1.** Desarrollo *in vivo* post desvitrificación y transferencia de embriones transgénicos y no transgénicos en estadio 4-células. / *In vivo development after vitrification and transfer of transgenic and non-transgenic embryos at the 4-cell stage.*

Grupo	Embriones Transferidos	Hembras		Crías		Relación Hembras/Machos
		Transferidas	Gestación	Nacidas	Destetadas	
Control Fresco	120	8	6 (75%)	50 (41,6%)	40 (80%)	0.90
Control vitrificado	146	16	10 (62,5%)	56 (38,3%)	48 (85,7%)	1.52
Ataxia Humana vitrificados	95	7	7 (100%)	47 (49,5%)	41 (87,2%)	1.15
Transferrina Humana vitrificados	100	7	6 (85,7%)	47 (47%)	14 (29,8%) <sup>†</sup>	1.33
Receptor CD46 vitrificados	45	3	3 (100%)	11 (24,4%)	11 (100%)	1.2

Control Fresco (Embriones no transgénicos no vitrificados); Control Vitrificado (Embriones no transgénicos vitrificados);

<sup>†</sup> 33 muertes de crías por canibalismo y muerte perinatal de madres nodrizas. Prueba de Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ).

<sup>†</sup> 33 deaths of pups due to cannibalism and perinatal death of nursing mothers. Chi-square test ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Comportamiento *in vitro* de los embriones pronucleares vitrificados y no vitrificados microinyectados con el vector lentiviral. / *In vitro behavior of vitrified and non-vitrified pronuclear embryos microinjected with the lentiviral vector.*

Pronucleares	Réplicas	Microinyección Lentiviral		Cultivo <i>in vitro</i>	
		n	Supervivencia	N	Fluorescentes PVF
Vitrificados	7	582	468 (80,4%)	130	23 (17,7%) <sup>a</sup>
No vitrificados (Control fresco)	14	1302	933 (71,6%)	170	76 (44,7%) <sup>b</sup>

Efecto del tratamiento: <sup>a,b</sup>  $p < 0,001$ . Prueba de Chi-cuadrado. Effect of the treatment: <sup>a,b</sup>  $p < 0,001$ . Chi-square test.

**Tabla 3.** Eficiencia de nacimientos crías viables y porcentaje de transgénesis en embriones pronucleares vitrificados y no vitrificados microinyectados con el vector lentiviral. / *Efficiency of viable offspring births and percentage of transgenesis in vitrified and non-vitrified pronuclear embryos microinjected with the lentiviral vector.*

Pronucleares	Total de embriones transferidos	Hembras transferidas	Promedio de embriones/hembra	Hembras gestadas	Crías Nacidas Viables	Crías positivas fluorescentes PVF
Vitrificados	266	11	24	8 (72,2%)	52 (19,5%)	13/52 (25%)
No vitrificados (Control fresco)	621	29	21	22 (75,9%)	147 (23,6%)	20/51† (39,2%)

†Se evaluó la expresión de PVF en 51 crías del total nacidas. Prueba de Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ).  
 †The expression of GFP was evaluated in 51 offspring out of the total born. Chi-square test ( $p < 0,05$ ).

Hasta la fecha sólo se han generado ratones transgénicos por lentitransgénesis utilizando embriones frescos (40-43). En esta investigación se reporta, por primera vez, el nacimiento de ratones transgénicos generados por lentitransgénesis utilizando embriones pronucleares vitrificados (Foto 1). Por sus implicaciones prácticas consideramos estos resultados pueden servir de base para su aplicación en otras especies de mayor interés económico.



**Foto 1.** Crías de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente obtenidos a partir de embriones pronucleares vitrificados y microinyectados con el vector lentiviral Lv-PVF. / *Offspring of transgenic mice expressing green fluorescent protein obtained from vitrified pronuclear embryos microinjected with the lentiviral vector Lv-PVF.*

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos corroboran la efectividad de la vitrificación de embriones con fines de protección de genofondos y la generación de ratones modificados genéticamente por lentitransgénesis.

## REFERENCIAS

- Bolton R.L., Mooney A., Pettit M.T., Bolton A.E., Morgan L., Drake G.J., et al. Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reprod Fertil.* 2022;3(3):R121-R46.
- Holt W.V., Comizzoli P. Genome resource banking for wildlife conservation: promises and caveats. *Cryo Letters.* 2021;42(6):309-20.
- Leibo S.P., Sztejn J.M. Cryopreservation of mammalian embryos: Derivation of a method. *Cryobiology.* 2019;86:1-9.
- Awasthi P.R., French C.F., Sztejn J., Bedigian R., Sharp J.J., Lloyd K.C. Frozen sperm as an alternative to shipping live mice. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2003;42(5):8-11.
- Agca Y., Agca C. Cryopreservation and Transplantation of Laboratory Rodent Ovarian Tissue for Genome Banking and Biomedical Research. *Methods Mol Biol.* 2021;2180:469-83.
- Takeo T., Nakao S., Nakagawa Y., Sztejn J.M., Nakagata N. Cryopreservation of mouse resources. *Lab Anim Res.* 2020;36:33.
- Shaw J.M., Nakagata N. Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods Mol Biol.* 2002;180:207-28.
- Hart-Johnson S., Mankelov K. Archiving genetically altered animals: a review of cryopreservation and recovery methods for genome edited animals. *Lab Anim.* 2022;56(1):26-34.
- Boubelik M., Cerna Z. A modified two-step method for cryopreservation of mouse embryos for purposes of embryo banking. *Folia Biol (Praha).* 1993;39(4):211-9.
- Taft R. Mouse Embryo Cryopreservation by Slow Freezing. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(5).

11. Shaw J.M., Diotallevi L., Trounson A.O. A simple rapid 4.5 M dimethyl-sulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev.* 1991;3(5):621-6.
12. Trounson A., Peura A., Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril.* 1987;48(5):843-50.
13. Oikonomou Z, Chatzimeletiou K, Sioga A, Oikonomou L, Tarlatzis B.C., Kolibianakis E. Effects of vitrification on blastomere viability and cytoskeletal integrity in mouse embryos. *Zygote.* 2017;25(1):75-84.
14. Ghandy N, Karimpur Malekshah A.A. Which Stage of Mouse Embryos Is More Appropriate for Vitrification? *Int J Fertil Steril.* 2017;10(4):357-62.
15. Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2003;9(6):583-605.
16. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:357-64.
17. Ali J, Shelton J.N. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 1993;98(2):459-65.
18. Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim.* 1997;46(3):231-4.
19. Zhou G.B., Hou Y.P., Jin F, Yang Q.E., Yang Z.Q., Quan G.B., et al. Vitrification of mouse embryos at various stages by open-pulled straw (OPS) method. *Anim Biotechnol.* 2005;16(2):153-63.
20. Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, et al. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(11-12):621-8.
21. Kaneko T, Nakagawa Y. Genome editing of rodents by electroporation of CRISPR/Cas9 into frozen-warmed pronuclear-stage embryos. *Cryobiology.* 2020;92:231-4.
22. Keskintepe L, Agca Y, Pacholczyk G.A., Machnicka A, Critser J.K. Use of cryopreserved pronuclear embryos for the production of transgenic mice. *Biol Reprod.* 2001;65(2):407-11.
23. Bagis H, Odaman H, Sagirkaya H, Dinnyes A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(2):173-9.
24. Maemura M, Taketsuru H, Nakajima Y, Shao R, Kakihara A, Nogami J, et al. Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Sci Rep.* 2021;11(1):11167.
25. Markoulaki S, Meissner A, Jaenisch R. Somatic cell nuclear transfer and derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Methods.* 2008;45(2):101-14.
26. Sung LY, Chang CC, Amano T, Lin CJ, Amano M, Treaster SB, et al. Efficient derivation of embryonic stem cells from nuclear transfer and parthenogenetic embryos derived from cryopreserved oocytes. *Cell Reprogram.* 2010;12(2):203-11.
27. Montoliu L. Transgenesis and Genome Engineering: A Historical Review. *Methods Mol Biol.* 2023;2631:1-32.
28. Aguiar J, Fernandez J, Aguilar A, Mendoza Y, Vazquez M, Suarez J, et al. Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci Lett.* 2006;392(3):202-6.
29. Perera Y, Cobas K, Garrido Y, Nazabal C, Brown E, Pajon R. Determination of human transferrin concentrations in mouse models of neisserial infection. *J Immunol Methods.* 2006;311(1-2):153-63.
30. Riego E, Limonta J, Aguilar A, Perez A, de Armas R, Solano R, et al. Production of transgenic mice and rabbits that carry and express the human tissue plasminogen activator cDNA under the control of a bovine alpha S1 casein promoter. *Theriogenology.* 1993;39(5):1173-85.
31. Toledo JR, Prieto Y, Oramas N, Sanchez O. Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009;157(3):538-44.
32. Zhao XM, Quan GB, Zhou GB, Hou YP, Zhu SE. Conventional freezing, straw, and open-pulled straw vitrification of mouse two pronuclear (2-PN) stage embryos. *Anim Biotechnol.* 2007;18(3):203-12.
33. Takeo T, Nakagata N. Cryobanking and Recovery of Genetically Modified Mice. *Methods Mol Biol.* 2020;2066:195-209.
34. Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A. Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(1).
35. Lamas S, Carvalheira J, Gartner F, Amorim I. C57BL/6J mouse superovulation: schedule and age optimization to increase oocyte yield and reduce animal use. *Zygote.* 2021;29(3):199-203.
36. Luo C, Zuniga J, Edison E, Palla S, Dong W, Parker-Thornburg J. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(4):471-8.
37. Hasegawa A, Mochida K, Inoue H, Noda Y, Endo T, Watanabe G, et al. High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biol Reprod.* 2016;94(1):21.

38. Pu XA, Young AP, Kubisch HM. Production of Transgenic Mice by Pronuclear Microinjection. *Methods Mol Biol.* 2019;1874:17-41.
39. Cheng PH, Chang YF, Mao SH, Lin HL, Chen CM, Yang SH. Lentiviral transgenesis in mice via a simple method of viral concentration. *Theorigenology.* 2016;86(6):1427-35.
40. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science.* 2002;295(5556):868-72.
41. Pfeifer A, Hofmann A. Lentiviral transgenesis. *Methods Mol Biol.* 2009;530:391-405.
42. Miao K, Guo M, An L, Xu XL, Wu H, Wang D, et al. A new method to efficiently produce transgenic embryos and mice from low-titer lentiviral vectors. *Transgenic Res.* 2011;20(2):357-63.
43. Koza P, Przybys J, Klejman A, Olech-Kochanczyk G, Konopka W. Generation of Transgenic Rats using a Lentiviral Vector Approach. *J Vis Exp.* 2020(159).

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** **Conceptualización:** B Ramos, JE Hernández, A Ramos. **Análisis de datos:** B Ramos, JE Hernández, A Ramos. **Investigación:** B Ramos, A Ramos, Y López. **Escritura del Borrador original:** B Ramos, JE Hernández. **Revisión, edición y aprobación de la revisión final del manuscrito:** B Ramos, JE Hernández, JL Suastegui.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)