

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**Electroporación de CRISPR-Cas9 en cigotos
murinos.**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Nicole Elenter – 204026

Tutor: Ana Paula Mulet Navarro

Co-tutor: Martina Crispo

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Nicole Elenter, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Trabajo final de carrera;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mi;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Nicole Elenter

1 de agosto del 2019

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a toda la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur, por haber compartido conmigo su conocimiento, apoyo, cariño y motivación. Formaron un equipo de trabajo maravilloso, donde encontré compañerismo y amabilidad. Agradezco a mi tutora PhD Ana Paula Mulet y co-tutora PhD Martina Crispo por brindarme un espacio en este extraordinario grupo, por sus consejos y excelente dirección. En particular a Ana Paula por guiarme en esta experiencia, con paciencia, entusiasmo y confianza. Gracias por siempre tener una respuesta a mis preguntas y por tu liderazgo que hizo de mi investigación una etapa muy placentera. Realmente aprecio su comprensión y disponibilidad a todas horas. Además, gracias a MSc Geraldine Schlapp y MSc María Noel Meikle por ayudarme, acompañarme y enseñarme. Ellas, junto con Ana Paula, participaron activamente del trabajo de esta tesis.

También quiero agradecer a todas las personas del Institut Pasteur que me asistieron durante este proyecto. Específicamente a MSc Marcela Díaz de la Unidad de Microscopía, por instruirme y acompañarme en lo relacionado a su área. A Martín Picovsky por su gran amabilidad y paciencia al ayudarme a realizar la totalidad de la estadística de este proyecto.

El apoyo de mi familia fue indispensable. Infinitas gracias a mis padres, por su bondad, fuerza, motivación y amor incondicional. Gracias a mis hermanos por ser mis compañeros de vida. A mis abuelos, tíos y primos por el apoyo, preocupación, diversión y amor constante.

Agradecer a mis amigas, hermanas que me dio la vida.

RESUMEN

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y los genes asociados a CRISPR (Cas) son elementos esenciales del sistema inmune adaptativo de algunas bacterias y arqueas, al intervenir en la eliminación de material exógeno invasor. Actualmente, el sistema tipo II de CRISPR es la herramienta más utilizada para la edición génica, permitiendo la obtención de diversos modelos animales. El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es el animal de investigación por excelencia. La generación de modelos murinos genéticamente modificados mediante la técnica de CRISPR implicaba necesariamente la microinyección de material exógeno en los ovocitos. Esta técnica presenta ciertas desventajas: personal altamente calificado, un trabajo laborioso y lento, causando la muerte del 50% de los embriones. Como alternativa a la microinyección surge la electroporación. Esta implica la generación de poros en la membrana de los cigotos mediante la aplicación de pulsos cortos. A diferencia de la microinyección, la electroporación se caracteriza por su simpleza, rapidez y costos de producción bajos.

Durante este trabajo se efectuó la puesta a punto de un protocolo para la generación de embriones genéticamente modificados mediante la electroporación de CRISPR-Cas9 en cigotos murinos. En primer lugar, se optimizó el tiempo de tratamiento con ácido tirodes (AT) de los cigotos. Con una solución de AT, se degradó un porcentaje de la zona pelúcida lo suficientemente alto para permitir el ingreso de las RNPs, sin ir en desmedro del desarrollo del embrión. Además, se determinó el protocolo óptimo para la generación de embriones *knockout* (KO) del gen *Clec4F*. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron electroporaciones de 10 pulsos de 30V, con una duración de 3ms y un intervalo entre pulsos de 100ms, y concentraciones de RNPs de 250ng/ μ l de proteína Cas9 y 300ng/ μ l

de sgRNA. Estas condiciones fueron determinadas con embriones de la cepa híbrida de ratones B6D2F1/J, obteniéndose un desarrollo a blastocisto de 16,4% y una de eficiencia de mutación de 70,0%. Se probó que este protocolo es válido para generar embriones KO para el mismo gen en la cepa consanguínea de ratones C57BL/6J. Se obtuvo para esta cepa un porcentaje de desarrollo a blastocisto de 6,5% y una eficiencia de mutación de 85,7%. Por último, se intentó insertar un sitio loxP en embriones de la cepa híbrida. Si bien no se obtuvo una alta eficiencia de *knockin* (KI), se lograron resultados de desarrollo y eficiencia de mutación de KO de 41,1% y 100,0% respectivamente.

PALABRAS CLAVE

CRISPR-Cas9, electroporación, embrión, *knockout*, ratón

ABREVIATURAS

AT: ácido tirodes

BSA: albúmina sérica bovina, del inglés *bovine serum albumin*

Buffer TE: buffer compuesto principalmente por Tris y EDTA

CaCl₂: cloruro de calcio

CaCl₂·2H₂O: cloruro de calcio dihidratado

Cas9: endonucleasa Cas9

CO₂: dióxido de carbono

COCs: complejos ovocitos- células del *cumulus*

CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

del: delección

DSB: corte doble hebra, del inglés *double strand break*

eCG: gonadotrofina coriónica equina

EtOH: etanol

FIV: fertilización *in vitro*

FSH: hormona foliculoestimulante, del inglés *follicle stimulating hormone*

hCG: gonadotrofina coriónica humana

HTF: medio de desarrollo, del inglés *human tubal fluid*

RH: recombinación homóloga

ins: inserción

IP: intraperitoneal

Kb: kilobase

KCl: cloruro de potasio

KH_2PO_4 : fosfato de potasio

KI: *knockin*

KO: *knockout*

LH: hormona luteoestimulante

MCI: macizo celular interno

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: cloruro de magnesio hexahidratado

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: sulfato de magnesio

ml: mililitro

ms: milisegundos

NaAc: acetato de sodio

NaCl: cloruro de sodio

NaHCO₃: bicarbonato de sodio

Na-lactato: lactato de sodio

Na-piruvato: piruvato de sodio

ng: nanogramo

nt: nucleótidos

NKT: del inglés *natural killer T*

ON: del inglés *over night*

PAM: motivo adyacente de protoespaciador, del inglés *protospacer adjacent motif*

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

RNPs: ribonucleoproteínas

SFB: suero fetal bovino

sgRNA: ARN guía de la Cas9

ssODN: molde de ADN utilizado en el mecanismo HDR, del inglés *single stranded oligonucleotides*

SPF: libre de patógenos específicos, del inglés *specific pathogen free*

μl: microlitro

V: voltios

WT: especie salvaje, del inglés *wild type*

ZP: zona pelúcida

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. MODELOS ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	14
1.1.1. Animales como modelos para la investigación de enfermedades humanas.....	15
1.1.1.1. El ratón de laboratorio como modelo predilecto en la experimentación	15
1.1.1.1.1. Características de los embriones murinos	18
1.1.1.1.1.1. Desarrollo embrionario.....	18
1.1.1.1.1.2. La zona pelúcida embrionaria.....	21
1.1.1.1.1.3. Metodologías para la producción de embriones.....	22
1.1.2. Modelos alternativos y 3Rs: reemplazo, reducción y refinamiento	23
1.1.3. Legislación sobre uso de animales en experimentación	23
1.2. METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.....	24
1.2.1. Recombinación homóloga en células madre embrionarias.....	26
1.2.2. Nuevas tecnologías con nucleasas programables.....	26
1.2.2.1. <i>Zinc Finger Nuclease</i>	28
1.2.2.2. <i>Transcriptor Activator-Like Effector Nucleases</i>	28
1.2.2.3. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	29
1.2.2.3.1. Origen del sistema CRISPR-Cas	29
1.2.2.3.2. Rol del sistema CRISPR-Cas en la inmunidad adaptativa	30
1.2.2.3.3. Sistema tipo II	31
1.2.2.3.4. CRISPR-Cas9 como herramienta para la edición génica	34
1.2.2.3.4.1. Microinyección como herramienta para introducir el sistema CRISPR	34
1.2.2.3.4.2. Electroporación como alternativa a la microinyección.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. METODOLOGÍA	38
3.1. ANIMALES.....	38
3.2. OBTENCIÓN DE EMBRIONES	39
3.2.1. Obtención de embriones por apareamiento natural.....	39

3.2.1.1.	Superovulación de hembras	39
3.2.1.2.	Apareamiento natural.....	40
3.2.1.3.	Recolección de embriones.....	40
3.2.2.	Obtención de embriones mediante fertilización <i>in vitro</i>	43
3.3.	DEGRADACIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA CON ÁCIDO TIRODES	44
3.3.1.	Tratamiento con ácido tirodes de los embriones murinos	44
3.3.2.	Medida de la degradación de la zona pelúcida	44
3.4.	PRODUCCIÓN DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS	45
3.5.	ELECTROPORACIÓN.....	46
3.6.	CULTIVO DE EMBRIONES.....	46
3.7.	EXTRACCIÓN DE ADN EMBRIONARIO	47
3.8.	EVALUACIÓN DE MUTACIONES.....	47
3.9.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1.	EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DISPONIBLES.....	49
4.2.	OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO TIRODES	52
4.3.	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ELECTROPORACIÓN ÓPTIMOS PARA LA GENERACIÓN DE EMBRIONES KO	56
4.3.1.	Análisis del impacto de la electroporación en el desarrollo.....	56
4.3.2.	Comparación de eficiencias de protocolos de electroporación	59
4.4.	EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL PROTOCOLO EN EMBRIONES DE LA CEPA C57BL/6	71
4.5.	EVALUACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA GENERACIÓN DE INSERCIONES PEQUEÑAS.....	76
5.	CONCLUSIONES.....	82
5.1.	PERSPECTIVAS	83
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
7.	COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	94

8.	ANEXO.....	97
8.1.	ANEXO 1.....	97
8.2.	ANEXO 2.....	100
8.3.	ANEXO 3.....	102
8.4.	ANEXO 4.....	103

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MODELOS ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

El interés de la humanidad por modificar la información genética y así el fenotipo de varias especies, surgió a partir de la domesticación. Desde del siglo XIX, se buscó entender el mecanismo de transmisión de los rasgos genéticos entre las generaciones, su herencia, evolución, formas de modificación y como los genes se incluyen, anulan o desaparecen dentro de una población. Mediante la biotecnología, la habilidad de mejorar el control sobre los genomas de varias especies aumentó, y las especies ancestrales salvajes son muy diferentes a las domesticadas de la actualidad. Este fenómeno, distribuido mundialmente, permitió la mejora de rasgos de interés humano. Especialmente en mamíferos, los esfuerzos se focalizaron en la mejora de rasgos en animales de compañía, ganadería y cría, y en los últimos años en el campo de la biomedicina (1).

Mediante la ingeniería genética, disciplina que abarca la manipulación, modificación o recombinación de ácidos nucleicos, se logró la obtención de modelos animales genéticamente modificados que son utilizados como biorreactores, en medicina regenerativa, para la mejora de la resistencia a enfermedades o como modelos que mimetizan enfermedades humanas (2,3). Se entiende por animal transgénico uno que contenga uno o varios genes foráneos, incorporados en su genoma de forma estable. El segmento recombinante de ADN doble hebra se denomina “transgen” (1,4).

1.1.1. Animales como modelos para la investigación de enfermedades humanas

Los modelos animales ocupan un rol central en la investigación biomédica. Estos pueden ser procariontes, invertebrados o vertebrados. Los vertebrados además de ser biológicamente y fisiológicamente similares a los humanos, son susceptibles a diversas enfermedades humanas. Por ejemplo, los chimpancés comparten más de 99% del ADN con los humanos, y los ratones más del 98% (4). Debido a la alta conservación genética entre genes homólogos, los vertebrados han sido preferentemente seleccionados como modelos animales. Estos permiten la investigación de las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas o animales, además de ser útiles en la docencia e investigación biológica y análisis de genes *in vivo*, entre otros (2,4,5).

Los modelos animales pueden clasificarse entre espontáneos o inducidos. Siendo aquellos espontáneos, los animales que imitan naturalmente enfermedades específicas del humano (6). Un ejemplo es la rata Zucker, usada como modelo para estudios de obesidad. Esta rata presenta una mutación autosómica recesiva en el gen *fa*, lo que conduce al desarrollo de obesidad en el organismo (7). Por otro lado, los modelos inducidos son aquellos que mediante una cirugía o manipulación presentan un estado fisiológico anormal, estos últimos surgen en gran medida mediante la manipulación genética (6).

1.1.1.1. *El ratón de laboratorio como modelo predilecto en la experimentación*

Entre los animales más utilizados como modelos se destacan la rata, el cobayo, el conejo y el ratón. El ratón, es uno de los modelos animales más usados, representado el 60% de los animales utilizados para experimentación (8). En los últimos años, el ratón de

laboratorio (*Mus musculus*) ha sido el animal de investigación por excelencia para el estudio de la biología y patología, y el estudio de enfermedades (9,10). Esto se debe a las similitudes entre el humano y el ratón en términos de fisiología y patología en el sistema nervioso, cardiovascular, endocrino, inmune, músculo-esquelético y otros órganos internos (11).

El ratón, es un mamífero perteneciente a la familia Muridae. Este pequeño animal tiene un peso promedio de 25 a 30 gramos, es omnívoro y goza de hábitos nocturnos. Su vida es en grupos y se caracterizan por establecer jerarquías sociales lideradas por machos agresivos. Es por esta razón que en los bioterios los ratones se crían en grupos, y aquellos conformados por machos se conforman al destete. Esos mamíferos poseen un olfato y oído desarrollado, sin embargo, su visión es pobre (12-14).

A pesar de presentar ciertas inconveniencias en su rol como modelo en lo que refiere a la recolección del material biológico, la administración de drogas y ejecución de técnicas quirúrgicas, las ventajas de su uso son significativas. Entre estas se notan, su homología con humanos, un pequeño tamaño, su sencillo cuidado y mantenimiento, la existencia de una diversidad de cepas bien definidas, una alta tasa de reproducción, un tiempo de generación corto, y un tiempo de vida relativamente corto que lo hace útil para ensayos crónicos de toxicología, virología y farmacología (9,10,14). Entre las aplicaciones más comunes se destacan las investigaciones de toxicidad, obesidad, neoplasia, parasitología, neurología, virología y farmacología (12–14).

En 1980, John Gordon y Frank Ruddle desarrollaron el primer ratón transgénico mediante la técnica de inyección pronuclear, y en 1988 se produjo el primer modelo de ratón *knockout* (KO) (4,15). Existe un enorme número de ejemplos de enfermedades que se estudiaron mediante el uso de ratones como modelos animales. Entre las investigaciones

realizadas, se puede destacar el estudio de síntomas del enanismo y posibles terapias (16). Además, modelos murinos fueron sensibilizados con alérgenos mediante una inyección intraperitoneal (IP) y luego desafiados a los alérgenos por las vías respiratorias para estudiar el asma (17). Otro ejemplo, es el estudio de obesidad y diabetes en ratones ob/ob, un organismo genéticamente modificado que no produce la hormona leptina (4).

Adicionalmente, se efectuaron estudios de carcinoma hepatocelular en modelos murinos KO del gen CCAR2 (*Cell Cycle and Apoptosis Regulator 2*). Esta enfermedad, es una de las neoplasias malignas más comunes y se desarrolla generalmente en el hígado. El factor de riesgo más frecuente para el desarrollo de carcinoma hepatocelular es la infección crónica por el virus de la hepatitis. La proteína nuclear CCAR2, también conocida como DBC1 (*Deleted In Breast Cancer 1*), cumple diversos roles en la célula, incluyendo la regulación de la apoptosis y el metabolismo e inhibe la recombinación limitando la iniciación y extensión en la resección final del ADN luego de un DSB (*Double Strand Break*) (18,19). Se ha expresado en bibliografía reciente que esta proteína podría cumplir un rol de indicador de diferentes cánceres, ya que se ha encontrado sobreexpresado este gen en organismos enfermos (18,20).

Como se mencionó anteriormente, los modelos animales no son utilizados únicamente para el estudio de enfermedades. La generación de modelos KO permite dilucidar las funciones biológicas de proteínas. Este fue el caso para la proteína CLEC4F, codificada por el gen clec4F, una lectina de tipo C capaz de unirse a galactosa y fucosa por su dominio de reconocimiento de carbohidratos (21,22). Se ha demostrado en modelos murinos KO de este gen, que las lectinas de tipo C están involucradas en la entrega de antígenos lipídicos a células presentadoras de antígeno. También conocida como receptor de células Kupffer (tipo de macrófagos residentes en el hígado), esta se expresa

únicamente en las células de Kupffer y facilita la presentación de α -Galactosylceramida a células NKT (*Natural Killer T*) (21). Adicionalmente, esta proteína presenta ortólogos en más de 100 especies.

1.1.1.1.1. Características de los embriones murinos

En la actualidad, existen diversas técnicas que permiten la obtención de ratones genéticamente modificados y éstas están supeditadas a la obtención de embriones murinos. En términos de legislación, los embriones no se consideran animales de experimentación puesto que un animal de laboratorio se define por el decreto 223/1988, como *“cualquier ser vivo vertebrado no humano, incluidas las formas larvarias autónomas capaces de reproducirse, con exclusión de formas fetales o embrionarias”*.

1.1.1.1.1.1. Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario se compone de cinco etapas: fertilización, segmentación, gastrulación, período embrionario y fetal. El desarrollo comienza con la fertilización del ovocito por el espermatozoide en el ámpula de la trompa uterina. Una vez que un espermatozoide logra penetrar el ovocito, la nueva entidad es llamada cigoto (Figura 1A). Luego de 4 o 5 horas es posible observar ambos pronúcleos, femenino y masculino, en el citoplasma. La zona pelúcida (ZP) y el espacio perivitelino rodean al cigoto (23) (Figura 2). A las 24 horas de la fertilización, el embrión se encuentra en un estadio de 2 células (Figura 1B) y continúa dividiéndose hasta formar una mórula (Figuras 1C y 1D). En esta etapa se comienza a acumular fluido en los espacios intercelulares de la mórula. Eventualmente, este líquido forma el blastocele que se expande hasta formar el blastocisto, 4,5 días luego de la fertilización (Figuras 1E y 1F). El blastocisto está formado por el macizo celular interno (MCI), células que darán lugar al embrión y por el trofoblasto que rodea al MCI y al blastocele. Luego, se produce la eclosión, donde la ZP se quiebra y se libera el

blastocisto (23,24). Durante estas etapas el cigoto se traslada por el oviducto hasta el útero donde se implanta 4,5 días luego de la fertilización (24). Posteriormente comienza la etapa de gastrulación, donde el blastocisto se transforma en gástrula, que se alarga para formar una estructura denominada “cilindro embrionario”. Entre los días 5 y 10 posteriores a la fertilización se forma el ectodermo, mesodermo y endodermo definitivo, lo que resulta en el período embrionario, donde el embrión sufre una serie de procesos de rotación. Finalmente, durante el período fetal, se efectúa un alto crecimiento y diferenciación de tejidos. Además, se terminan de desarrollar los órganos primarios. Esta etapa culmina con el nacimiento (23).

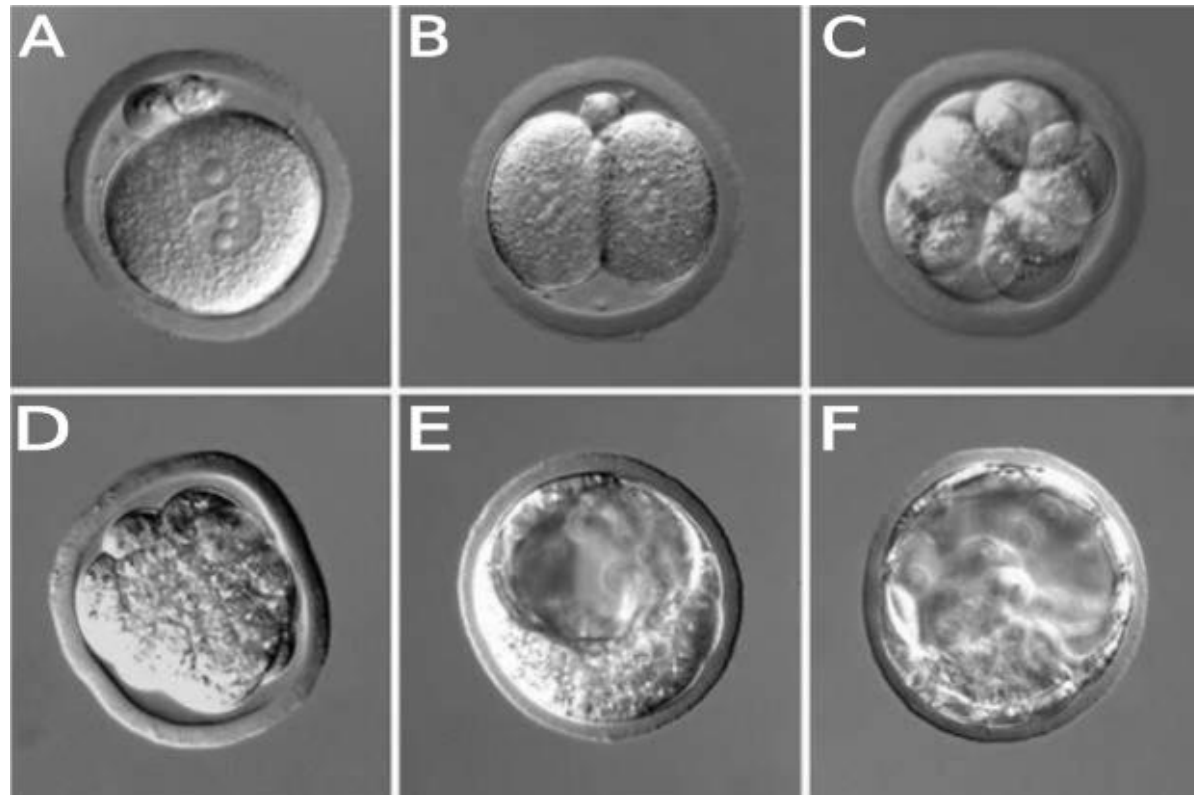


Figura 1- Etapas del desarrollo embrionario murino previas a la implantación. (A) Ovocito fecundado de una célula. (B) Embrión de dos células. (C) Embrión de 8 células. (D) Mórula. (E) Blastocisto temprano. (F) Blastocisto expandido. Imagen tomada por el Instituto Max Plank de Inmunología y Epigenética (25).

1.1.1.1.2. La zona pelúcida embrionaria

Como se detalló anteriormente, la ZP es una estructura que rodea al ovocito. Esta es una estructura de glicoproteínas presente en embriones de mamíferos (Figura 2). Cumple un rol en la fecundación del ovocito, ya que posterior a la entrada de un espermatozoide ésta sufre modificaciones y protege al embrión de la polispermia, daños físicos y químicos (26). Esta tiene un grosor de $7\mu\text{m}$, y es permeable a moléculas menores de 170kDa . La ZP se compone de tres glicoproteínas sulfatadas, denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, codificadas por los genes *Zp1*, *Zp2* y *Zp3*. Estos genes presentan una sola copia localizada en los cromosomas 19, 7 y 5 respectivamente (27). Adicionalmente, la ZP se compone también de ácido hialurónico, que podría influenciar la motilidad del espermatozoide (28).

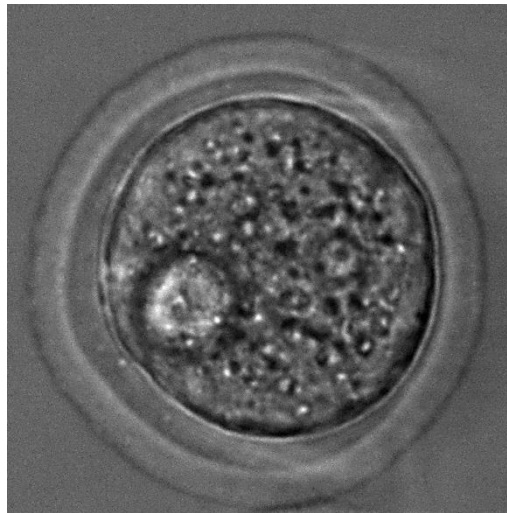


Figura 2- Cigoto murino rodeado por la ZP. Entre ellos se encuentra el espacio perivitelino. Fotografía tomada con un microscopio invertido (40x).

1.1.1.1.1.3. Metodologías para la producción de embriones

La generación de modelos murinos genéticamente modificados, mediante la modificación de embriones, requiere de la obtención de un gran número de éstos. Esto requiere en primer lugar de la inducción de la ovulación de hembras donantes de embriones para obtener numerosos ovocitos (28). El mecanismo para inducir la ovulación de hembras murinas es la superovulación (23). Esta consiste en la inyección IP de hormonas que simulan las hormonas FSH (hormona foliculoestimulante) y LH (hormona luteoestimulante), ambas marcadoras del ciclo reproductivo. La superovulación se ha probado en diferentes cepas murinas, entre las que podemos encontrar a la cepa consanguínea C57BL/6J y la cepa híbrida B6D2F1/J. Existen diversas hormonas comerciales que permiten efectuar la superovulación en estas cepas murinas, entre las que se destacan la gonadotropina coriónica equina (eCG) o la CARD HyperOva, inyectadas en combinación con la gonadotropina coriónica humana (hCG). Naturalmente, las hembras murinas, de las cepas C57BL/6J y B6D2F1/J, ovulan aproximadamente 6 embriones. Luego de la superovulación con la hormona eCG es posible obtener 30 embriones por hembra aproximadamente (29), y con la HyperOva cerca de 100 embriones (28).

El siguiente paso en la obtención de los embriones es la fertilización de los ovocitos, que se puede efectuar mediante dos mecanismos diferentes (30). En primer lugar, se puede realizar el apareamiento natural de hembras y machos y una posterior recolección de los cigotos ubicados en el oviducto. Una alternativa a esto, es la recolección de ovocitos y su posterior inseminación por fertilización *in vitro* (FIV). Esta consiste en la fertilización de ovocitos en el laboratorio por espermatozoides capacitados y su posterior incubación (29).

1.1.2. Modelos alternativos y 3Rs: reemplazo, reducción y refinamiento

En la actualidad, los modelos animales son indispensables en la investigación biomédica. No obstante, estos deben ser reemplazados por métodos alternativos siempre que sea posible. Por técnicas alternativas, se entiende aquellas que reemplazan el uso de animales, reducen su número o refinan la técnica o procedimiento para minimizar el daño animal (31). Estas tres estrategias se denominan las 3 Rs y deben ser aplicadas durante el desarrollo del protocolo de experimentación animal y la aplicación del mismo. En primer lugar, se presenta el reemplazo que consiste en la obtención de una cantidad similar de resultados utilizando métodos que no incluyan animales de laboratorio, o utilizando aquellos que sean menos sensibles al dolor. El reemplazo puede ser relativo (reducción del número de animales en el ensayo) o absoluto. Existen diversos métodos alternativos, como ser cultivos celulares o modelos informáticos. Además, la reducción se basa en un mejor diseño del protocolo para obtener el máximo de información, con la utilización del menor número de animales posible. Esto incluye un buen análisis estadístico de los datos. Por último, se describe el refinamiento que incluye todos los procedimientos que afecten la vida del animal de laboratorio y permitan reducir su dolor o malestar (32,33).

1.1.3. Legislación sobre uso de animales en experimentación

La primera reglamentación establecida para el control en la experimentación animal data del 1876 y es de origen inglesa. “*Cruelty to Animals Act*” expresaba la obligación de obtener licencias personales para llevar a cabo experimentos con vertebrados vivos. En el año 2010, la Directiva Europea enunció una normativa especificando las obligaciones de los experimentadores. En ésta se detallaba que era obligatorio el registro del establecimiento, cumplir con estándares de alojamiento, la capacitación y autorización del

personal, la utilización del mínimo número de animales posibles y de aquellas especies de menor sensibilidad neurofisiológica o métodos alternativos.

En setiembre 2009 se creó la ley nacional N° 18.611: Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica. En ésta se establecen las normas a seguir dentro del territorio uruguayo. No obstante, la guía para experimentación animal que siguen la gran mayoría de los investigadores es de origen norteamericana y es denominada *The Guide*. Esta guía data del año 2011 y explicita todos los vertebrados usados en experimentación, los conceptos claves de cuidado, las especificaciones de alojamiento, ambiente y manejo (34).

Estas normativas rigen la experimentación con animales, permitiendo la creación de modelos animales genéticamente modificados facilitando la investigación biológica.

1.2. METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

La ingeniería genética permite la alteración del genoma de diversos organismos. Esta área se compone de un conjunto de técnicas con la habilidad de manipular, modificar y/o recombinar el ADN de un organismo o una población (2). Estas herramientas hacen posible la obtención de animales genéticamente modificados, que son útiles en diversas áreas como ser la farmacéutica, agroindustria y biomedicina.

Existen diversas técnicas que permiten realizar modificaciones genéticas (35). La microinyección pronuclear es la primer tecnología que permitió la generación de ratones transgénicos (15), la misma consiste en el aislado de cigotos y la inyección de ADN exógeno purificado en uno de los pronúcleos de un cigoto. Siendo ésta una metodología

pasiva, se espera que la célula utilice sus mecanismos propios para integrar el transgen en su genoma. La microinyección pronuclear presenta numerosas desventajas como ser procesos complejos, equipamiento caro, necesidad de personal altamente calificado, baja eficiencia de mutación (10%), integración y expresión impredecible del transgen y mosaicismo. Además, la ubicación de la integración del ADN exógeno es aleatoria (1,36).

Otra técnica utilizada para la generación de animales transgénicos es la transgénesis mediada por lentivirus (LV). Estos vectores virales son retrovirus complejos que permiten la administración de genes exógenos con una alta eficiencia de integración. La utilización de este virus requiere de la división de su genoma viral en diversos fragmentos. Esto último permite evitar la formación de virus competentes capaces de enfermar al organismo huésped (37). Esta técnica presenta desventajas como un tamaño de inserto reducido (menor a 9kb), integración del transgen en varias locaciones del genoma huésped y la dificultad de la obtención de un título viral alto libre de contaminación (1).

Adicionalmente, los transposones pueden ser utilizados como vehículos para la introducción de genes exógenos de manera estable en un organismo huésped. Estos elementos transponibles deben ser introducidos en conjunto con una transposasa. Esta metodología presenta diversas desventajas como una ubicación aleatoria del sitio de inserción del transgen. No obstante, la eficiencia de inserción en ratones puede ser de hasta 90% (1).

Las técnicas anteriormente mencionadas permitieron la generación de animales transgénicos, sin embargo, todas presentan una gran desventaja en común, la imposibilidad de dirigir la mutación a un *locus* específico. Esto imposibilita la obtención de mutantes KO, introduce variaciones en la expresión de los transgenes dependiendo de

la localización en el genoma y puede interrumpir genes generando un fenotipo que enmascare o se confunda con el de la inserción de interés.

1.2.1. Recombinación homóloga en células madre embrionarias

La recombinación homóloga en células madre embrionarias murinas o *gene targeting* surge como alternativa a las técnicas antes mencionadas, permitiendo dirigir los cambios en el genoma. Esta técnica se basa en la recombinación homóloga (RH), un proceso que ocurre naturalmente en las células y consiste en el intercambio de nucleótidos entre dos secuencias similares. El ADN de interés es introducido en células ES mediante su electroporación y posteriormente se identifican aquellas que hayan incorporado el vector de interés. Las células ES seleccionadas son inyectadas en el blastocelo de un blastocisto. Estas células tienen la capacidad de renovarse y características pluripotenciales por lo que pueden colonizar el macizo celular interno generando una quimera. Esta metodología puede ser utilizada para generar ratones KO y KI (*knockin*) (1,38). No obstante, esta técnica presenta varias desventajas como el tiempo requerido para la generación, la baja variedad de células ES disponibles, la complejidad de la metodología y una eficiencia de recombinación reducida en células eucariotas (1,39).

1.2.2. Nuevas tecnologías con nucleasas programables

Las nuevas técnicas de edición génica se basan en el uso de nucleasas programables. Estas técnicas involucran la generación DSB en un *loci* específico (5). Los DSB generados son reparados por la célula mediante dos mecanismos distintos. Un sistema de reparación de los DBS es el NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) o sistema de reparación de extremos no homólogos. Este consiste en la unión de los extremos de la doble hebra cortada,

insertando o eliminando bases al azar en el proceso (Figura 3). Estas pequeñas modificaciones pueden alterar el gen blanco, causando su silenciamiento (40). Esto es muy útil cuando se intenta promover la pérdida de función de un gen, generando un modelo KO. Por otro lado, el sistema de reparación por RH o HDR (*Homology Directed Repair*) permite la inserción de mutaciones específicas al suministrar un molde con fragmentos homólogos al sitio de inserción, habilitando la generación de organismos KI (Figura 3) (39,41).

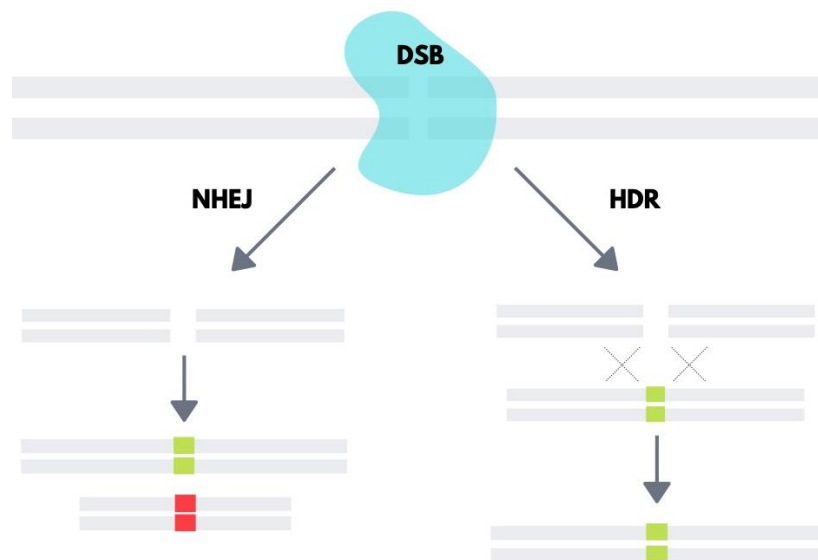


Figura 3- Mecanismos de reparación celulares de los DSB. El mecanismo NHEJ se modeliza a la izquierda. Este resulta en la inserción o delección de pocas pares de bases. El mecanismo de reparación HDR se presenta a la derecha, permite la inserción de una secuencia exógena mediante la adición de un molde de ADN con secuencias homólogas al DSB. En celeste se modeliza la nucleasa generadora de los DSB, en gris las secuencias nucleotídicas, en verde las inserciones y en rojo las delecciones.

1.2.2.1. *Zinc Finger Nuclease*

La ZNF (*Zinc Finger Nuclease*) fue uno de los primeros métodos desarrollados para edición génica basada en nucleasas programables. Un dominio ZF se compone de 30 aminoácidos que poseen la capacidad de unirse a 3 pares de bases específicos. Las ZFNs pueden diseñarse para unirse a casi cualquier triplete. Estas contienen un dominio específico de unión al ADN, fusionado a uno de clivaje (dominio de la endonucleasa FokI). Para efectuar una modificación genética se necesitan al menos dos moléculas ZFNs, ya que el dominio nucleasa debe dimerizarse para cumplir su función de corte. Para incrementar la especificidad se pueden unir 3 o más moléculas ZF, lo que resulta en el reconocimiento de 9 o más pares de bases (1,42). Se pueden enumerar ciertas desventajas de esta técnica como ser la dificultad de la construcción de la nucleasa o de efectuar el corte por la estructura de la cromatina en los sitios *target* (1).

1.2.2.2. *Transcriptor Activator-Like Effector Nucleases*

Como alternativa al uso de las ZFN, surgen las nucleasas TALENS o *Transcriptor Activator-Like Effector (TALE) Nucleases*. Este sistema utiliza una proteína originaria de la bacteria fitopatogena *Xanthomonas spp.*, que se une al ADN de células vegetales y activa varios promotores que favorecen la supervivencia del patógeno. Los TALEs son factores de virulencia de patógenos vegetales, contienen un dominio de unión al ADN que consiste en 30 copias de repetidos en tándem, cada uno con 33-35 aminoácidos (43). Estos repetidos reconocen cada uno un aminoácido. Los TALENs son proteínas que surgen de la combinación de un TALE y la proteína FokI. Poseen dos subunidades, cada una constituida por un dominio nucleasa (FokI) y un dominio de unión a ADN (TALE) (44).

Entre las ventajas de las TALENs se destaca una mayor facilidad para diseñar el sitio de unión al ADN en comparación con las ZFNs, ya que cada repetido reconoce una base del ADN. Además, los sitios *target* son largos, lo que disminuye las mutaciones en sitios no específicos. No obstante, su principal desventaja es la dificultad para generar la construcción (1).

1.2.2.3. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

1.2.2.3.1. Origen del sistema CRISPR-Cas

La novedosa herramienta CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - Cas9) utilizada para la obtención de organismos genéticamente modificados es cada vez más popular, siendo utilizada a diario por laboratorios en el campo de la investigación. Esta surge luego de la aparición de las ZFNs y TALENs, como alternativa más simple para la edición génica (45).

CRISPR y los genes asociados a CRISPR (Cas) son partes esenciales del sistema inmune adaptativo de algunas bacterias y arqueas al intervenir en la eliminación de material exógeno invasor. Estos *loci* fueron descubiertos en bacterias en la década del 1980 y en arqueas en 1990 (46,47).

El sistema CRISPR se compone de ARNs cortos que reconocen secuencias de ADN invasor y guían un complejo enzimático para degradarlo. Su estructura sigue un patrón específico compuesto por una secuencia líder, espaciadores y repetidos (Figura 4) (1).



Figura 4- Estructura del sistema CRISPR, compuesta por un patrón específico con una secuencia líder (en gris) y repetidos cortos (en celeste) que flanquean espaciadores (en verde).

Las secuencias repetidas son cortas (30-40pb) y palindrómicas (39). Estas se separan por espaciadores que son provenientes de un ADN invasor. La secuencia líder se sitúa en el extremo 5' y contiene un dominio promotor compuesto por dos cajas separadas entre sí por 17pb y un dominio de unión de ribosomas. Esta secuencia cumple funciones de anclaje a proteínas (rica en AT) y es crucial para la adquisición de nuevos espaciadores y para la síntesis de crRNAs. Los genes Cas codifican proteínas encargadas de las funciones efectoras del sistema. Estas intervienen en el reconocimiento del ADN invasor, la incorporación de espaciadores y su recombinación, entre otras (45).

1.2.2.3.2. Rol del sistema CRISPR-Cas en la inmunidad adaptativa

El mecanismo de acción de este sistema, en el marco de la inmunidad, se basa en tres etapas: adaptación, biogénesis de crRNAs (CRISPR RNA) e interferencia.

La adaptación es el mecanismo por el cual se adquieren nuevos espaciadores y se genera memoria en la inmunidad del organismo. En la mayoría de los casos, cuando una bacteria se enfrenta a un invasor, ésta muere. Sin embargo, cuando la partícula viral presenta errores de replicación, la bacteria consigue sobrevivir al ataque. La bacteria incorpora protoespaciadores (nombre que se le da al fragmento que será un espaciador mientras está en el organismo de origen) que contienen un motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) de forma adyacente. El motivo PAM tiene una longitud de 3 a 5pb dependiendo del organismo, y es lo que utiliza el sistema para unirse al ADN exógeno. Cuántos más

espaciadores específicos de un virus halla incorporado la bacteria, más rápida será su defensa contra este virus (48,49). Los mecanismos de adquisición de los espaciadores no están completamente dilucidados.

La segunda etapa es la biogénesis de crRNAs. Los crRNAs son los que confieren la especificidad al sistema, al guiar a la Cas9 por su homología con el gen *target*. Durante la biogénesis estos pequeños ARNs se expresan y maduran (39,48).

Por último, la interferencia se da cuando los ARNs que circulan se encuentran con una partícula viral que esté expresando el o los gen/es homólogos (debe estar presente una horquilla). Es necesario que el crRNA forme un complejo con el tracrRNA (*trans-activating RNA*) para lograr unirse a la nucleasa que generara el DSB en el ADN invasor (1,48).

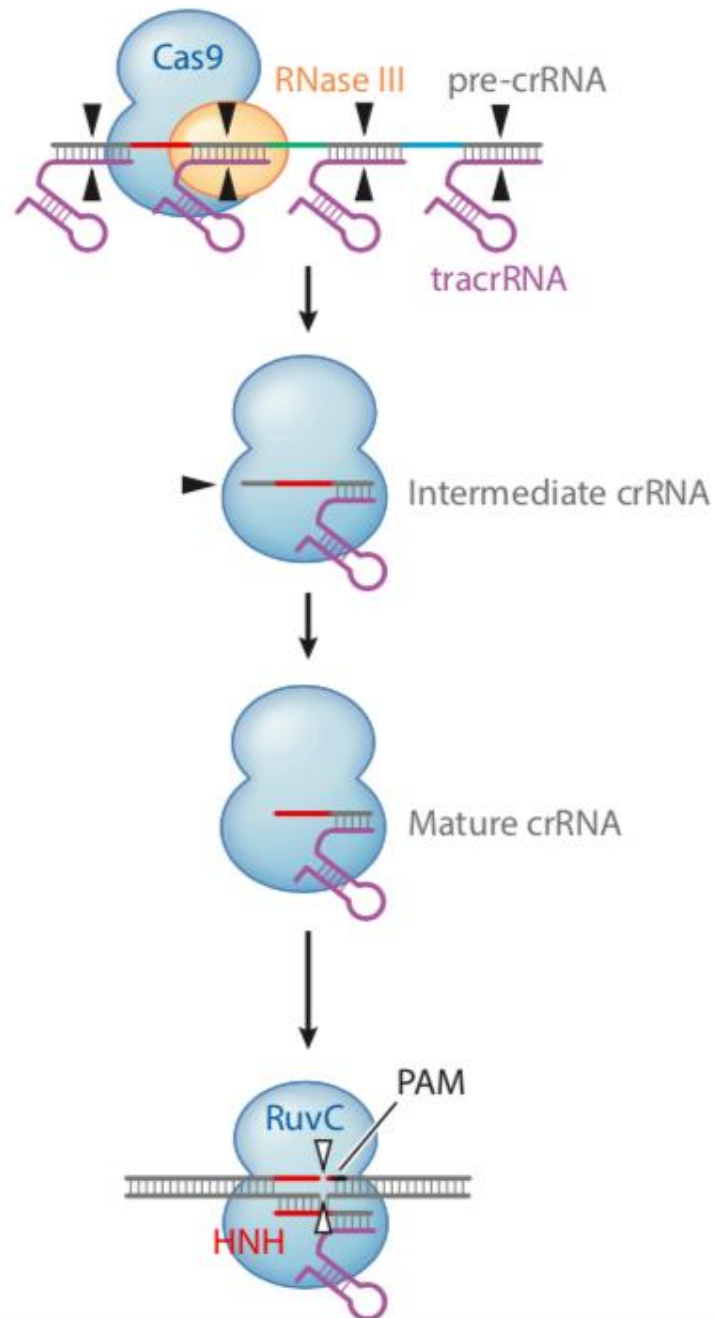
1.2.2.3.3. Sistema tipo II

Se han descubierto 3 grandes mecanismos CRISPR, I, II y III. Estos comparten únicamente los genes *cas1* y *cas2* y difieren en su gen marcador. El sistema tipo I se caracteriza por poseer el gen *cas3*, el tipo II la endonucleasa *cas9* y el III por el gen *cas10* (Figura 5) (39,42).

El sistema tipo II ha sido el más estudiado debido a su simpleza. Este está constituido por cuatro genes: *cas9*, *cas1*, *cas2* y *csn2* o *cas4* (dependiendo del subtipo A o B respectivamente) (48). En este último caso, el ADN exógeno viral o plasmídico es escindido en pequeños fragmentos de aproximadamente 20pb e incorporado al *locus* CRISPR en medio de secuencias repetidas cortas. Cuando se transcribe el *loci* los transcriptos resultantes son procesados para generar pequeños RNAs (crRNA-CRISPR RNA) que son utilizados para guiar a la endonucleasa Cas a secuencias invasoras

complementarias (39). La biogénesis en este sistema es particular ya que requiere de la acción de un tracrRNA para la maduración de los crRNAs (48). Se distingue de otros mecanismos ya que necesita de una única proteína, Cas9, para el silenciamiento génico (1). Cas9 es la responsable de procesar los crRNAs y clivar el ADN blanco, para lo cual posee 2 dominios nucleasa: el dominio RuvC ubicado en el extremo amino terminal y el dominio HNH ubicado en la región intermedia de la proteína. Durante el corte del ADN blanco, los dominios HNH y RuvC generan DSB, el primer dominio corta la hebra complementaria mientras que el segundo la no complementaria (39,50). En el caso de Cas9 la secuencia PAM es NGG. La simpleza del sistema CRISPR II reside en que demanda únicamente de 3 componentes (Cas9, crRNA y trRNA), lo que lo hace un mecanismo ideal para la edición genómica (1).

Figura 5- Mecanismo de acción del sistema tipo II de CRISPR-Cas. Las puntas de las flechas indican rupturas de ácidos nucleicos. Imagen tomada y modificada de Jian *et al.* (39).



1.2.2.3.4. CRISPR-Cas9 como herramienta para la edición génica

El sistema CRISPR-Cas9 permite de manera sencilla activar, inhibir, regular o modificar genes en un solo paso. Actualmente, el sistema tipo II de CRISPR del organismo *Streptococcus pyogenes* es la herramienta más utilizada para la edición génica (1).

Como fue establecido anteriormente, este sistema cuenta simplemente con tres componentes: la endonucleasa Cas9 capaz de generar DSB, un CRISPR RNA complementario al sitio blanco y un *trans-activating* RNA necesario para la unión del crRNA a la nucleasa. Sin embargo, el sistema puede ser simplificado aún más con la hibridación de ambos ARNs. Para ésto se debe generar la síntesis del sgRNA o *single guide RNA*. Es crítico aclarar que para la inserción de mutaciones específicas se debe adicionar un molde o ssODN (*Single Stranded Oligonucleotides*) (51).

La tecnología CRISPR es una herramienta robusta que permite la edición del genoma, con aplicaciones en diversas especies (1). Este sistema presenta varias ventajas en comparación con las técnicas mencionadas anteriormente. Mientras que su diseño es sencillo, ya que la nucleasa no debe ser modificada, sólo debe serlo el sgRNA, el de ZFN o TALEN es más complejo. Además, presenta una mayor especificidad y eficiencia y su costo es más bajo. Sin embargo, comparte algunas desventajas con las ZFNs y las TALENs, como ser una herencia de la mutación dificultosa o la complejidad de mutar secuencias que estén repetidas en el genoma (42).

1.2.2.3.4.1. Microinyección como herramienta para introducir el sistema CRISPR

La microinyección se basa en la inyección de material exógeno en el núcleo o citosol de la célula *target* (52). La generación de ratones KO por CRISPR/Cas9 es llevada a cabo principalmente por esta técnica, que cuenta con la ventaja de tener una alta eficiencia, así como diseños experimentales bien definidos y establecidos. Sin embargo, las desventajas

son considerables pues no solo requiere de personal altamente calificado, sino que supone un trabajo sumamente laborioso y lento (debido a la microinyección de cada embrión por separado) e implica costos asociados elevados. A su vez conlleva un alto riesgo de generación de mosaicismo en el organismo blanco y la aplicación de la técnica en sí resulta en la muerte del 50% de los embriones (40).

Mediante la microinyección de CRISPR se han editado genes en diferentes modelos de roedores y animales de experimentación (1). En ratones, se efectuó la generación de múltiples modelos transgénicos mediante la generación de mutaciones en diversos genes (53-55). También se ha utilizado para la obtención de cerdos, cabras y ovejas KO (56-58).

1.2.2.3.4.2. Electroporación como alternativa a la microinyección

Como alternativa a la microinyección surge la electroporación, que permite el ingreso de las ribonucleoproteínas (RNPs) a la célula blanco por medio de poros transitorios en membranas celulares (59,60).

Estos poros son generados tras la aplicación de pulsos unipolares cortos, ocasionando una alteración electroquímica en la bicapa lipídica de la membrana celular. La formación de poros inicia con la penetración de moléculas de agua en la bicapa lipídica, causando la reorientación de los lípidos adyacentes. El radio de los poros transitorios no supera los pocos nanómetros (60).

Diversas moléculas cargadas pueden atravesar estos poros, pasando del medio extracelular al intracelular o viceversa. Se denomina electroporación reversible, cuando los poros son transitorios luego de la estimulación eléctrica y electroporación irreversible

si estos son permanentes. Esto último ocasionaría la muerte celular y puede ser causado por pulsos demasiado largos o voltajes altos (61).

La electroporación presenta diversas aplicaciones como la transformación de células bacterianas con plásmidos facilitando la transferencia del ADN a través de las membranas celulares (62) o la entrega transdermal de oligonucleótidos o proteínas terapéuticas (61). Además, tiene diversas aplicaciones en la medicina como ser la electroquimioterapia o la ablación no térmica de tejidos. En los últimos años, la electroporación permitió efectuar modelos animales KO y KI, especialmente en ratones, mediante la introducción de componentes del sistema CRISPR-Cas9 en cigotos (40, 41, 51, 59, 63).

Existen diversos parámetros de la electroporación que deben ser puestos a punto para cada técnica. Estos incluyen el voltaje, número y duración de los pulsos y el intervalo entre éstos. Estos últimos dependerán también del tipo de electroporador utilizado.

A diferencia de la microinyección, la electroporación se caracteriza por su simpleza y rapidez, ya que se pueden electroporar hasta 50 embriones murinos a la vez. Además, los costos de producción son significativamente menores. A pesar de ello, es una técnica que requiere de altas concentraciones de reactivos y no hay diseños experimentales definidos para la introducción de CRISPR-Cas9 en cigotos (40,41). En consecuencia, es de gran importancia la elaboración de diseños experimentales que permitan la generación de organismos genéticamente modificados utilizando la técnica de electroporación para la inserción de CRISPR-Cas9, y que aseguren a su vez, una alta eficiencia

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Puesta a punto de un protocolo para la generación de embriones murinos genéticamente modificados mediante la electroporación de CRISPR-Cas9.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimización del tratamiento con AT para la remoción de una fracción de la ZP embrionaria.
- Determinación de los parámetros de electroporación óptimos para la generación de embriones mutantes del gen *Clec4F* de la cepa híbrida B6D2F1/J.
- Validación del protocolo en embriones de la cepa consanguínea C57BL/6J.
- Determinación de la capacidad del protocolo de generar otro tipo de modificaciones en embriones de la cepa B6D2F1/J.

3. METODOLOGÍA

A no ser que se indique lo contrario, todos los químicos utilizados fueron obtenidos de Sigma Aldrich (MO, USA).

3.1. ANIMALES

Los animales utilizados en este trabajo fueron criados en el Bioterio del Institut Pasteur de Montevideo, categorizado como un bioterio libre de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*). Los animales se mantuvieron alojados en estanterías ventiladas individualmente (Sealsafe rack, Tecniplast, Milán, Italia), en habitaciones con presión positiva, a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 40-60% de humedad relativa y ciclos de luz/oscuridad de 14/10 horas. El protocolo utilizado en el presente proyecto fue oportunamente evaluado y aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo (#007-18), cumpliendo con la ley nacional 18.611 y las pautas internacionales de cuidado animal (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) con respecto a los protocolos de animales de laboratorio. Se utilizaron 4 hembras de la cepa C57BL/6J y 44 de la cepa B6D2F1/J.

3.2. OBTENCIÓN DE EMBRIONES

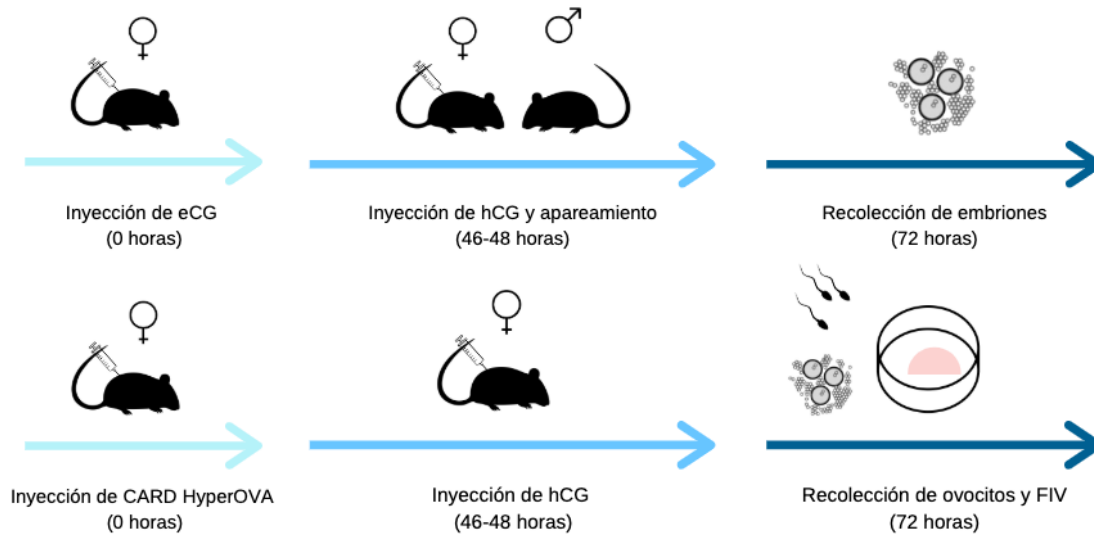


Figura 6- Cronograma de superovulación y recolección de embriones. El esquema superior demuestra la obtención de embriones mediante apareamiento natural y el inferior la obtención de embriones por FIV.

3.2.1. Obtención de embriones por apareamiento natural

3.2.1.1. *Superovulación de hembras*

Se indujo la superovulación de hembras de al menos 3 semanas de edad mediante la inyección de 5UI de la hormona eCG (Novormon, Syntex, BA, Argentina), seguida a las 46 horas de 5UI de la hormona hCG (Chorulon, Intervet International B.V., Boxmeer, Netherlands). Ambas inyecciones se realizaron por vía IP en un ángulo de 45 grados con respecto al animal en la región abdominal (Figura 7).

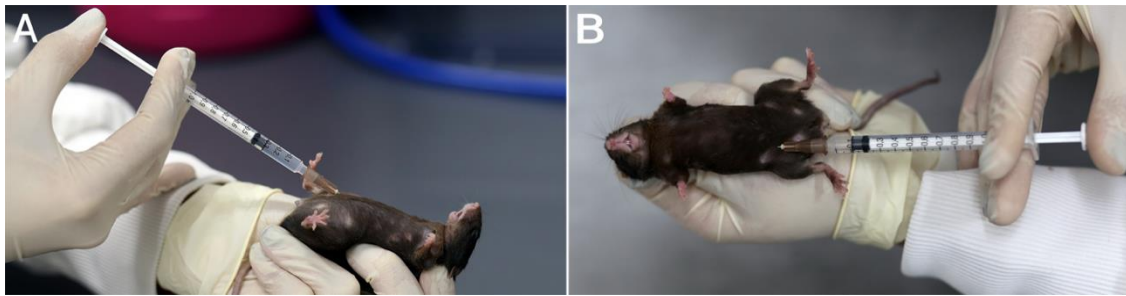


Figura 7- Superovulación de las hembras donantes de embriones. (A) Ángulo de inyección entre la aguja y el animal. (B) Sitio de la región abdominal donde se efectúa la inyección hormonal. Las hormonas eCG y hCG se inyectan con este método.

3.2.1.2. *Apareamiento natural*

Luego de finalizada la superovulación, las hembras fueron apareadas con machos de la misma cepa. La fecundación fue verificada mediante la observación del tapón vaginal en las hembras donantes a la mañana siguiente.

3.2.1.3. *Recolección de embriones*

Las hembras que presentaron signos de copulación fueron sacrificadas por dislocación cervical. Luego, se realizó un corte en el pelaje (Figura 8B) y el peritoneo en la zona abdominal inferior (Figura 8C). Se movió el tracto digestivo hacia el costado para una mejor visualización del aparato reproductor de la hembra (Figura 8D). El tejido graso unido al útero fue removido mecánicamente (Figura 8E y Figura 8F). Posteriormente, se realizó un corte entre el ovario y el oviducto, obteniéndose el ovario aislado. Este se encuentra yuxtapuesto al ampulla, donde se encuentran los embriones. Se introdujeron los ovarios disecados en hialuronidasa y el ampulla fue rasgada para liberar a los embriones. La introducción en hialuronidasa se efectuó para favorecer el desprendimiento de las células del *cumulus* de los embriones y así aislarlos. Se registraron los tipos de embriones

obtenidos y se conservaron únicamente aquellos viables y con la ZP intacta. Los embriones recolectados fueron lavados tres veces en gotas de 100µl de medio M2.

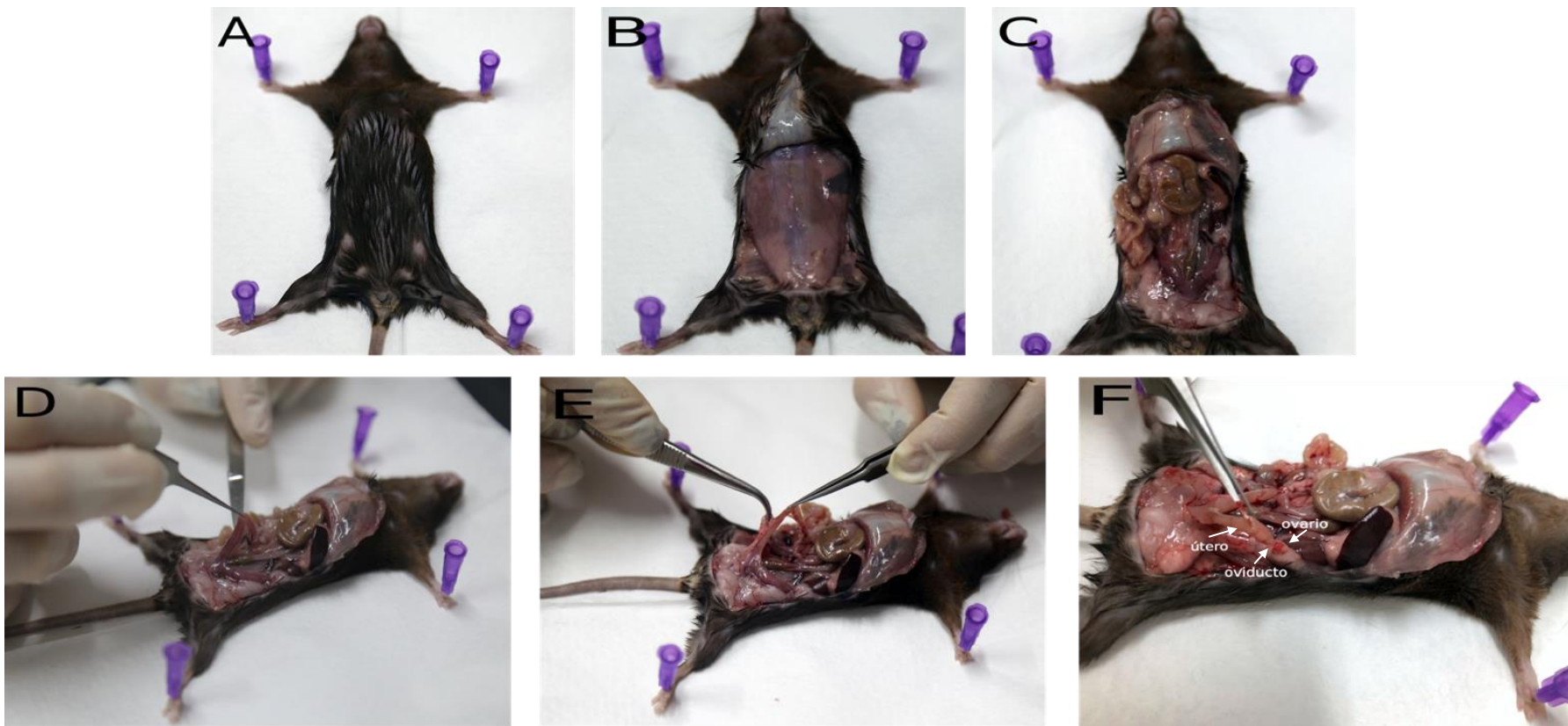


Figura 8- Recuperación de embriones. (A) Asepsia de la zona abdominal inferior y sus proximidades con etanol (70%). (B) Sección de la piel y pelaje del animal, visualización del peritoneo. (C) Anatomía de una hembra disecada. Los intestinos se desplazan para una mejor visualización del útero (forma en V). (D), (E) Remoción mecánica de la grasa conectada al útero. (F) Sección entre el ovario y el oviducto para aislar el ampulla conteniendo a los embriones.

3.2.2. Obtención de embriones mediante fertilización *in vitro*

La obtención de embriones mediante FIV es una alternativa a la obtención por apareamiento natural descrita anteriormente. La superovulación de las hembras donantes de embriones fue realizada mediante inyección IP de 0,1ml de suero antiinhibina CARD HyperOva (Cosmo Bio, Tokio, Japón). A las 46 horas se inyectaron de 5UI de hCG por la misma vía. Luego de efectuada la superovulación, se realiza la recolección de ovocitos a la mañana siguiente como se describe en el punto 3.2.1.3. No obstante, los ovocitos recolectados no fueron introducidos en hialuronidasa, sino en gotas de 300µl de medio CARD (Cosmo Bio) cubiertas con aceite mineral. Se adicionó el esperma liberado del epidídimo murino (perteneciente a la misma cepa de las hembras donantes), en una gota de 100µl de FERTIUP (Cosmo Bio) cubierto con aceite mineral. Esta suspensión se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 60 minutos para capacitar el esperma. Luego, se recuperó una alícuota de 3µl de la solución de esperma, se transfirió a la gota conteniendo los COCs (Complejos Ovocitos - células del *cumulus*) y se incubó a 37°C con 5% de CO₂, durante 3 horas. Posteriormente, se efectuaron tres lavados de los ovocitos en gotas de 80µl de medio HTF (*Human Tubal Fluid*) (100 mM NaCl, 50mM KCl, 2mM MgSO₄·7H₂O, 4,0mM KH₂PO₄, 51mM CaCl₂, 250mM NaHCO₃, 28mM Glucosa, 0,4mM Na-lactato, 3,4mM Na-piruvato, 2,2mM Penicilina G, 0,9mM Estreptomicina, 0,6mM BSA (*Bovine Serum Albumin*), 0,01mM Rojo Fenol, en 100ml de agua), y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 5-6 horas.

3.3. DEGRADACIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA CON ÁCIDO TIRODES

3.3.1. Tratamiento con ácido tirodes de los embriones murinos

Se usaron dos fuentes distintas de ácido tirodes (AT). Uno comercial y uno casero (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM CaCl₂H₂O, 1,0mM MgCl₂6H₂O, 5,5mM Glucosa y 0,1mM polivinilpirrolidona, pH 2,5). Los cigotos aislados y mantenidos en medio M2 fueron transferidos a gotas de 100µl de AT. Estos fueron tratados durante un tiempo variable de acuerdo al ensayo (15, 30, 60 o 90 segundos) y luego lavados tres veces en gotas de 100µl de M2.

3.3.2. Medida de la degradación de la zona pelúcida

El porcentaje de degradación de la ZP se analizó tomando fotografías de embriones con un microscopio invertido Olympus IX81 (Olympus, Tokio, Japón). El ancho de la ZP se midió con el software ImageJ versión 2.0.0 (64) en cuatro puntos equidistantes (Figura 9). Los datos obtenidos fueron promediados para obtener la media por embrión. El porcentaje de degradación se obtuvo por comparación con un control, al que se le adjudicó un porcentaje de degradación de 0,0%.

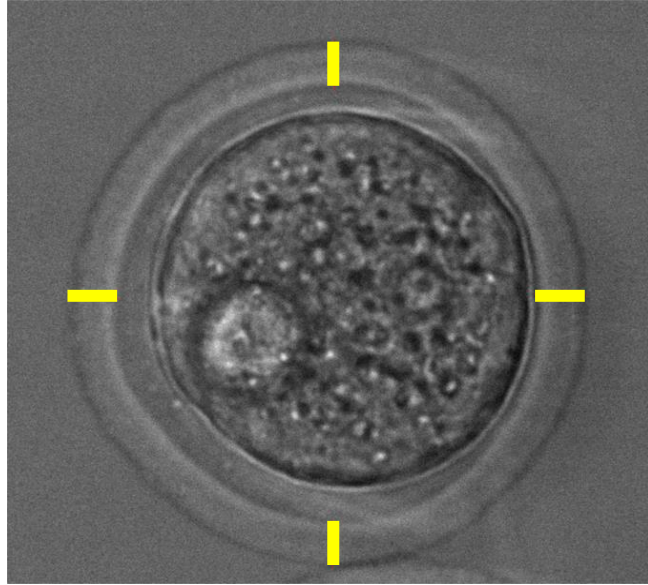


Figura 9- Ejemplo de la medida de la ZP de un embrión murino. Se mide el ancho de la ZP en 4 puntos diferentes de cada embrión (líneas en amarillo). Fotografía tomada con un microscopio invertido (40x).

3.4. PRODUCCIÓN DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS

Para la obtención de la mezcla de RNPs se mezclaron 250ng/ μ l de proteína Cas9 (Synthego, CA, USA), 300ng/ μ l de sgRNA (Synthego) y buffer TE (Synthego) en un volumen de 12 μ l. El *mix* fue incubado a 37°C por 10 minutos y mantenido a 0°C hasta su utilización. En el caso de KI se agregó al mix anterior 600ng/ μ l de ssODN (IDT, IA, USA).

Las secuencias sgRNAs y ssODN usadas en este experimento se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1- sgRNA y ssODN utilizados en los ensayos de electroporación.

Gen	Tipo de ácido nucleico	Secuencia
Clec4F	sgRNA	UGGACGUGCCGCAGGGUCCU
	sgRNA	UAUAAACCCAGAGGUCU
CCAR2	ssODN	GAAGCAATCTCCAGGAATTGCACCTACTACCCGAAG CACTAGAAGATAGCCAGAGGATCTATAACTTCGTAT <u>AGCATACATTATACGAAGTTATGAATTCGACATTCA</u> GAAAAACACCCAAGAGCCATAGTTTTTGAAACTGAG TCTCGAGCATGTTCTG

El ssODN contiene un sitio loxP que se encuentra subrayado, el resto de los nucleótidos son los brazos de homología utilizados para la recombinación.

3.5. ELECTROPORACIÓN

Se utilizó un electroporador ECM830 de onda cuadrada (BTX, MA, USA) con una cubeta de 1mm de *gap*. Se adicionaron a la cubeta 10µl de la solución de RNPs, 10µl de OptiMEM y hasta 50 cigotos. Luego de la electroporación se adicionaron 100µl de medio M2 con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) precalentado a la cubeta. Los embriones fueron recuperados con una pipeta de plástico de diámetro de 1mm. Luego, se realizaron entre 3 a 5 lavados de la cubeta para asegurar la recuperación de la mayor cantidad de embriones posibles. Los embriones transformados fueron lavados 3 veces en gotas de 100µl de medio M2.

3.6. CULTIVO DE EMBRIONES

Los embriones se cultivaron hasta la etapa de blastocistos en gotas de 50µl de medio M16 a 37°C con 5% de CO₂. El desarrollo se analizó durante 96 horas. A las 24 horas de la electroporación se evaluó el porcentaje de clivaje de embriones a 2 células, a las 72 horas

se analizó su desarrollo a mórula. Por último, se evaluó a las 96 horas el desarrollo a blastocisto, donde se analizan los blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados.

3.7. EXTRACCIÓN DE ADN EMBRIONARIO

Una vez desarrollados los blastocistos, se procedió a extraer su ADN. La extracción de ADN se llevó a cabo usando el kit de extracción de ADN Arcturus PicoPure (Thermo Scientific, NY, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada embrión fue incubado junto con 15µl de la mezcla de extracción a 60°C por 3 horas y luego a 90°C durante 10 minutos.

3.8. EVALUACIÓN DE MUTACIONES

La amplificación del gen *target* se efectuó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una PCR semi-anidada. Se efectuaron reacciones de 25 o 10µl utilizando la enzima Ranger DNA Polymerase (Bioline, LDN, UK), buffer de reacción 5X (Bioline), 1,0µM de cada oligonucleótido y 1,3 o 5,0µl de molde de ADN. Los oligonucleótidos (IDT) usados se resumen en la Tabla 2. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos 94°C, 30 o 45 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 56 o 58°C y 40 segundos a 72°C, 5 minutos a 72°C y 10 minutos a 4°C .

Tabla 2- Oligonucleótidos utilizados para estudios de PCR en embriones murinos.

Gen	Cebador sentido	Cebador antisentido	Cebador antisentido2*	Tamaño de amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
Clec4F	TCTTTATGATCGCA CCCACA	CATTCTGGGTCA GCTCAAT	TCCATTCTCGAGAG CCATCT	650 y 545	56 y 58
CCAR2	TCAGAACATGCTC GAGACTCA	GCCTCATCTCTAG CCACAGG	-	600	56

La verificación de una correcta amplificación del gen *target* se realizó por electroforesis en gel de agarosa (1,5%) (Invitrogen, NY, USA). Se sembraron 0,5µg de 1kb DNA Ladder (Invitrogen) como marcador de peso molecular

Posteriormente, se realizó el análisis de mutación mediante la técnica de secuenciación (Macrogen, Korea), seguida de un análisis de las secuencias utilizando el software Mega7 versión 2.1 (65) y Ice Analysis (Synthego).

3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Las medidas de degradación de la ZP, recuperación, sobrevivida, clivaje a dos células, desarrollo embrionario, y eficiencia de mutación de los grupos experimentales fueron comparadas mediante una regresión lineal, con el Software Stata (Stata Corp, TX, USA).

Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DISPONIBLES

Trabajos anteriores de varios autores han definido condiciones de electroporación óptimas en sus ensayos. Una revisión de aquellos trabajos en donde se utilizó el mismo equipamiento con el que contamos (electroporador ECM830 de onda cuadrada) reveló una variedad muy grande de condiciones utilizadas. En todos los casos se emplearon cubas de electroporación de 1mm, siendo esta la única constante en todos los trabajos revisados. Las cepas utilizadas fueron principalmente C57BL/6J y B6D2F1/J, los embriones obtenidos, en la mayoría de los ensayos fueron tratados con AT para degradar parcialmente la ZP, este tratamiento varió en tiempo entre 10 y 60 segundos, degradando entre un 15 y un 30% de la misma. En la mayoría de los casos se introdujo la Cas9 en forma de proteína, en una concentración que varía entre 250 y 1280ng/μl. El sgRNA se utilizó en concentraciones de entre 24 y 400ng/μl, siendo uno de los parámetros más variables encontrados. En los casos de introducir un molde, se usaron siempre ssODN, en concentraciones de entre 54 y 1000ng/μl. El voltaje de la electroporación fue en todos los casos de 30V, se realizaron entre 1 y 6 pulsos cada 100ms y la duración de cada uno fue de entre 1 y 3ms. En un caso, esta electroporación fue repetida 6 veces cada 3 segundos.

La eficiencia de mutación en estos trabajos se relaciona en mayor medida con el gen *target* y no con el protocolo en sí. Qin *et al.* demostró eficiencias de entre 0,0 y 100,0% utilizando el mismo protocolo para generación de KO (51). De igual forma, Chen *et al.* obtuvieron un rango de eficiencias de mutación amplio (4,0-67,0%), según el gen ensayado (41). Trö *et al.* presentaron el rango más alto de la bibliografía consultada de

66,0 y 100,0% (40). No obstante, estos artículos difieren en los genes *target*, por lo que una comparación entre sus resultados no es válida. Wang *et al.* obtuvo el porcentaje de KI mayor, 81.3% (53). Las principales características de los artículos revisados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3- Artículos revisados antes del comienzo del proyecto.

Referencia	Qin <i>et al.</i>		Chen <i>et al.</i>		Wang <i>et al.</i>	Modzelewski <i>et al.</i>		Trö <i>et al.</i>	
Tipo de modificación	KO	KI	KO	KI	KI	KO	KI	KO	KI
Cas9	600ng/μl (mRNA)	400ng/μl (mRNA)	652ng/μl (proteína)		250ng/μl (proteína)	1280ng/μl (proteína)		640ng/μl (proteína)	
sgRNA	300ng/μl	200ng/μl	24ng/μl		300ng/μl	400ng/μl		25ng/μl	
ssODN	-	400ng/μl	-	100ng/μl	1000ng/μl	-	107 ng/μl	-	54ng/μl
Pulsos	30V, 2 pulsos, 1ms, 100ms		30V, 2 pulsos, 3ms, 100ms		30V, 2 pulsos, 1 ms, 100ms (X6)*	30V, 6 pulsos, 3ms, 100ms		30V, 2 pulsos, 3ms, 100ms	
AT	10 segundos (30%)		30-60 segundos (15-20%)		10 segundos (30%)	30-40 segundos (30%)		-	
Hembras	B6D2F1/J		C57BL/6J		B6D2F1/J ó C57BL/6NJ	C57BL/6J		C57BL/6NRj	
Machos	B6D2F1/J		C57BL/6J		B6D2F1/J	C57BL/6J		C57BL/6NRj	
Eficiencia de mutación	0,0-100,0%	27,0%	4,0-67,0%	46,0%	81,3%	3,0-100,0%	14,0-63,0%	66,0-100,0%	23,0-44,0%

*realización de 6 electroporaciones con 3 segundos de diferencia entre cada electroporación (se efectuó una totalidad de 12 pulsos).

Los trabajos presentados anteriormente demuestran una diversidad amplia de protocolos, variando en distintos parámetros de electroporación como ser la duración y número de pulsos, el tiempo de tratamiento de los embriones con AT y la concentración de las RNPs adicionadas. Se decidió realizar ensayos para determinar los parámetros de electroporación óptimos, manteniendo constante el voltaje de los pulsos (30V) y 100ms de intervalo entre pulsos.

4.2. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO TIRODES

El primer parámetro del ensayo que se decidió optimizar fue el tratamiento de los embriones con AT. Este tiene el objetivo de una degradación parcial de la ZP embrionaria.

La ZP es una estructura de glicoproteínas que protege al embrión de la polispermia, daños físicos y químicos (26). En consecuencia, la ZP podría representar una barrera para la entrada de las RNPs capaces de generar la modificación genética deseada.

Con el objetivo de debilitar esta barrera y permitir el correcto ingreso de los componentes del sistema CRISPR-Cas, se puede degradar la ZP con una solución de AT. Una degradación de un 30% representa el compromiso correcto entre la entrada de los componentes del sistema utilizado y una baja influencia negativa en el desarrollo embrionario (66).

El tiempo de tratamiento de los embriones presenta grandes variaciones dependiendo de la solución y la cepa embrionaria utilizada, por lo que debió ser evaluado y puesto a punto.

Con el fin de evaluar la eficiencia de degradación de la solución de AT comercial, los embriones fueron tratados durante 0, 15, 30, 60 y 90 segundos. Posteriormente, se midió la degradación de la ZP y se analizó el desarrollo a blastocisto a las 120 horas (Tabla 4, Figura 10).

Como era previsto, la degradación de la ZP aumentó con el tiempo de tratamiento. El mayor porcentaje de degradación obtenido fue de 18,0% con un tratamiento de 90 segundos (Tabla 4). Este resultado es significativamente mayor ($P = 0,001$) al porcentaje de degradación obtenido con el tratamiento de 15 segundos y el control (0,7 % y 0,0%, Tabla 4). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de 30, 60 y 90 segundos. Tampoco se observaron diferencias significativas en el desarrollo de los embriones, indicando que este porcentaje de degradación de la ZP no afecta la sobrevida del embrión. La totalidad de las medidas efectuadas de las distintas ZPs se detallan en el Anexo 1.

Qin *et al.* y Chen *et al.* determinaron que la degradación del 30% se obtiene en 10 segundos de tratamiento con AT (41,51). En otros trabajos, este porcentaje de degradación se obtuvo con tratamientos de entre 30 y 40 segundos (66). En nuestro caso, la degradación pareció ser mucho más lenta, por lo que se decidió comparar esta solución de AT con una casera en el entendido de que su eficiencia pudo haberse visto reducida por las condiciones de almacenamiento u otros factores.

Tabla 4- Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con el AT comercial.

Duración del tratamiento con AT	Porcentaje de degradación (embriones analizados)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos / embriones totales)
0 segundos	0 (n=20) ^a	65,00 (13/20) ^a
15 segundos	0,68 (n=10) ^a	64,28 (9/14) ^a
30 segundos	7,89 (n=10) ^b	52,17 (12/23) ^a
60 segundos	14,28 (n=20) ^b	43,48 (10/23) ^a
90 segundos	17,98 (n=20) ^b	50,00 (11/22) ^a

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las condiciones ensayadas, que se consideran cuando $P < 0,05$.

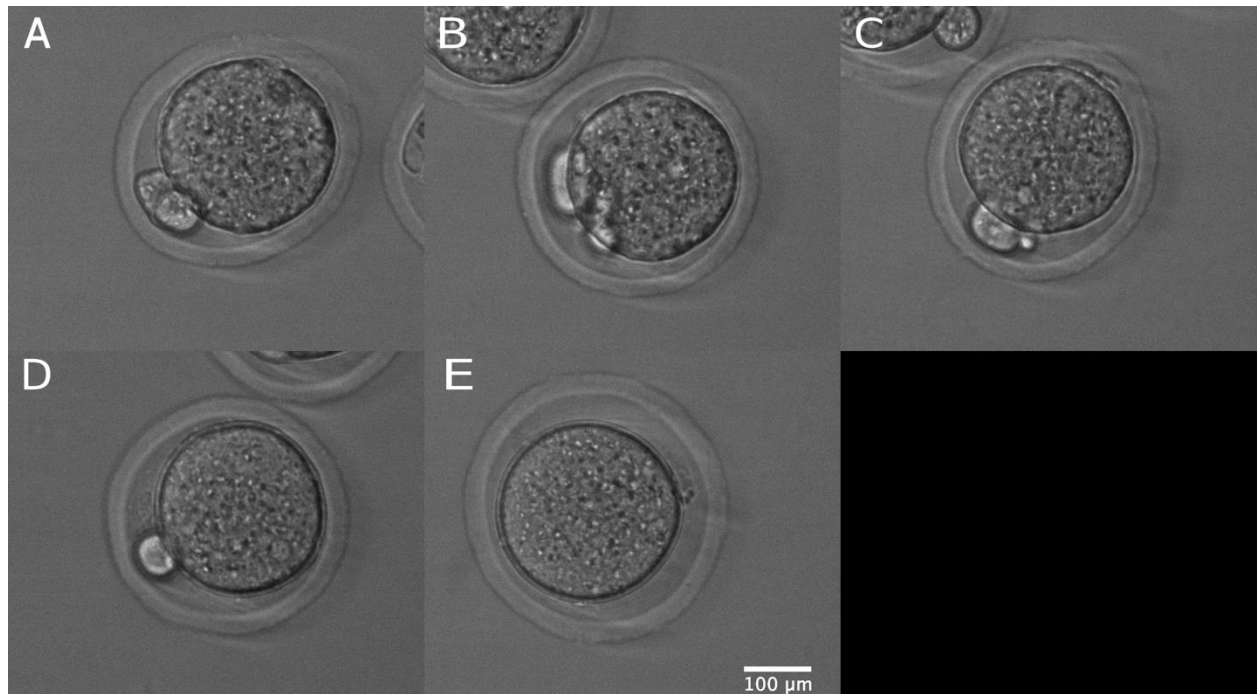


Figura 10- Medida de degradación de la ZP de embriones murinos mediante el tratamiento con AT. A modo de ejemplo, se adicionó la fotografía de un embrión por tratamiento, dónde fue medido el ancho de la ZP. A- 0 segundos (grupo control) B- 15 segundos C-30 segundos D-60 segundos E-90 segundos.

Según Andrew Modzelewski y colaboradores (66), la duración óptima de tratamiento con AT es cercana a la mitad del tiempo que se requiere para degradar la totalidad de la ZP. En vista de esto, se realizó un ensayo en donde se comparó el tiempo requerido por tres soluciones diferentes para degradar totalmente la ZP. Estas soluciones fueron el AT comercial, AT casero y hialuronidasa. Se incluyó la solución de hialuronidasa ya que el ácido hialurónico forma parte de la ZP de los embriones murinos (28). Se añadieron 5 embriones a cada una de estas soluciones debajo de un microscopio invertido y mediante la grabación de un video se evaluó el tiempo requerido por cada solución para degradar la totalidad de la ZP (Tabla 5).

Se observó que el tiempo para degradar la totalidad de la ZP con el AT comercial era de 2 minutos y 20 segundos. Una degradación total que conlleva un tiempo mayor a 2 minutos se relaciona con un mal funcionamiento de la solución y la misma debería ser sustituida (66). El AT casero degradó la ZP antes de que los embriones pudieran ser enfocados, lo que llevó aproximadamente un minuto. Esto llevó a no poder obtener una cifra clara del tiempo que conlleva una degradación total con esta solución. No obstante, se pudo suponer que ésta era menor a 30 segundos, ya que una vez enfocados los embriones se encontraban deformados, lo que sucede al exponer prolongadamente los embriones desnudos a la solución ácida. La ZP de los embriones tratados con hialuronidasa permaneció intacta durante los cinco minutos del ensayo.

En función de estos resultados se decidió seguir trabajando con la solución de AT casera por lo que se realizó un ensayo final para determinar su impacto en el desarrollo embrionario. Para esto, se trataron cigotos con AT casero durante 10 segundos y luego de lavarlos se cultivaron hasta blastocistos. En este ensayo se obtuvo un porcentaje de desarrollo a blastocisto de 60,0%, que si bien es menor que el 80,0% obtenido para el grupo control permite obtener de igual forma un

porcentaje alto de embriones desarrollados que eventualmente pueden derivar en animales modificados.

Tabla 5- Evaluación de diferentes soluciones para la degradación de la ZP.

Solución	Tiempo para la degradación total de la zona pelúcida
AT comercial	2 minutos 20 segundos
AT casero	< 1 minuto*
Hialuronidasa	>5 minutos**

* Durante el ensayo con AT casero, existieron problemas con el enfoque de los embriones durante 1 minuto. Cuando estos lograron ser enfocados la ZP estaba totalmente degradada. ** Durante 5 minutos la ZP permaneció intacta.

4.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ELECTROPORACIÓN ÓPTIMOS PARA LA GENERACIÓN DE EMBRIONES KO

Posteriormente se determinaron los parámetros óptimos de electroporación que permitieran obtener tanto buena sobrevida y desarrollo embrionario, como un porcentaje satisfactorio de embriones genéticamente modificados.

4.3.1. Análisis del impacto de la electroporación en el desarrollo

Con el objetivo de determinar el efecto de distintas condiciones de electroporación en el desarrollo embrionario, se efectuó un ensayo comparando seis condiciones distintas dónde no fueron

adicionadas RNPs. Este ensayo se realizó con embriones de la cepa B6D2F1/J. Las condiciones ensayadas y los resultados de desarrollo se detallan en la Tabla 6.

En vista de respetar la reducción del número de animales por ensayo y el refinamiento, estrategias de las 3Rs (32), los embriones utilizados en este ensayo fueron obtenidos mediante la superovulación tradicional con la hormona eCG. Esta última permite la obtención de 30 embriones por hembra de la cepa B6D2F1/J aproximadamente (29), en lugar de 6.

Todos los embriones pertenecientes a este ensayo fueron aislados, lavados y tratados o no, dependiendo de la condición ensayada con AT, durante 10 segundos. Posteriormente, estos fueron electroporados, recolectados y lavados con M2 precalentado. Finalmente, estos embriones fueron cultivados hasta blastocistos. Las condiciones ensayadas varían en el número y duración de los pulsos, y la presencia o no de un tratamiento con AT. Se mantuvieron constantes pulsos de 30V con 100ms de intervalo entre pulsos y se ensayaron 4, 6 y 10 pulsos de 1 y 3ms de duración.

Se ensayaron 3 condiciones contando con pulsos de 3ms de duración. Los embriones del grupo 1 contaron con un tratamiento de AT previo a la electroporación y un número de 10 pulsos de 3ms (Tabla 6). Los embriones de los grupos 5 y 6 no incluyeron un tratamiento con AT, y contaron con 4 o 10 pulsos respectivamente (Tabla 6). Adicionalmente, se analizaron 3 condiciones con pulsos de 1ms de duración. Dos de ellas incluyendo un tratamiento con AT de 10 segundos de duración y un número de pulsos de 6 o 10, grupos 2 y 3 respectivamente (Tabla 6). Finalmente, el grupo 4 presentó 10 pulsos de 1ms de duración, sin la presencia de un tratamiento de los embriones con AT (Tabla 6).

El desarrollo a blastocisto del grupo control (grupo 7, Tabla 6) fue significativamente mayor (79,0%, Tabla 6) al hallado para la totalidad de los grupos ensayados ($P < 0,05$). Este valor está en

concordancia con observaciones previas de especialistas que indicaron que el desarrollo a blastocisto de los embriones de esta cepa es de aproximadamente 80,0% (67).

El grupo 5 presentó un desarrollo a blastocisto de 10,5% (Tabla 6). Este resultado es significativamente menor al obtenido con otros grupos ($P < 0,05$). Los grupos 2, 3, y 4 presentaron porcentajes de desarrollo de 14,3%, 12,5% y 15,6% respectivamente (Tabla 6), de igual significancia estadística. Estos últimos grupos, contaron todos con pulsos de 1 ms de duración. Adicionalmente, los grupos 1 y 6 presentaron desarrollos significativamente mayores a los grupos anteriormente mencionados (50,0 y 37,3% respectivamente, $P < 0,05$, Tabla 6).

Interesantemente, los grupos presentando el mayor desarrollo se corresponden a las condiciones más agresivas, 10 pulsos de 3ms con y sin tratamiento de AT (50,0 y 37,0% respectivamente, Tabla 6). Puesto que la mayoría de los ensayos de este estilo culmina en la transferencia de embriones a hembras receptoras, no se encontraron datos bibliográficos de desarrollo a blastocisto en embriones de esta cepa que hayan sufrido una electroporación. No obstante, al presentar los resultados de desarrollo más altos se eligieron como óptimos para los siguientes ensayos. Además, estas condiciones permitirían una eficiencia más alta puesto que pulsos más largos podrían generar una mayor entrada de las RNPs al embrión.

Tabla 6- Desarrollo embrionario a blastocisto en función de los parámetros de electroporación.

Grupo	Condiciones de electroporación (número de pulsos, duración, tratamiento con ácido)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos / embriones totales)
1	10 pulsos, 3ms, c/AT	50,00 (11/22) ^d
2	6 pulsos, 1ms, c/AT	14,29 (2/14) ^c

3	10 pulsos, 1ms, c/AT	12,50 (4/32) ^c
4	10 pulsos, 1ms, s/AT	15,63 (5/32) ^c
5	4 pulsos, 3ms, s/AT	10,53 (2/19) ^b
6	10 pulsos, 3ms, s/AT	37,29 (22/59) ^d
7	Control	78,67 (59/75) ^a

c/AT: los embriones recibieron un tratamiento con AT de 10 segundos. s/AT: los embriones no recibieron ningún tratamiento con AT. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

4.3.2. Comparación de eficiencias de protocolos de electroporación

Una vez definidas las condiciones que originaban los mejores resultados de desarrollo a blastocisto (10 pulsos de 3ms con o sin tratamiento de AT) se procedió a efectuar un ensayo para evaluar si las mismas eran capaces de producir embriones mutados y con qué eficiencia.

Con el objetivo de aumentar el número de embriones evaluado en cada condición, y a su vez disminuir el número de animales utilizados se usó para superovulación de hembras el suero antiinhibina en reemplazo de la hormona eCG. Como esta hormona aumenta la cantidad de ovocitos obtenidos por hembra, de 30 embriones con superovulación tradicional a 100 (29), no es posible fertilizarlos por cruzamiento natural. Por este motivo los ovocitos fueron obtenidos y se procedió a realizar una fertilización *in vitro*. Esta combinación permitió obtener resultados más robustos usando una menor cantidad de animales, lo que está alineado con los principios de Refinamiento y Reducción de las 3Rs.

Para evaluar la eficiencia de mutaciones se eligió el gen *target* Clec4F. La guía diseñada se ubica en el exón 2 del gen (Ensembl, # ENSMUST00000014686.2), dónde oportunamente se pudo ubicar también una secuencia PAM (Figura 11). Esta guía había sido usada previamente para obtener un KO mediante microinyección obteniéndose una eficiencia del 50,00% (datos no publicados).



Figura 11- Exón 2 del gen Clec4F. La secuencia reconocida por el sgRNA se encuentra en naranja (desde el nt 36 al 55) y la secuencia PAM en marrón (desde el nt 33 al 35).

Durante este ensayo de electroporación se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: 10 pulsos de 30V con 100ms de intervalo entre pulsos, y la adición de proteína Cas9 a 250ng/μl y sgRNA a 300ng/μl. Con el objetivo de encontrar el protocolo óptimo para generar un KO del gen Clec4F, se ensayaron 4 condiciones que variaban en la duración de los pulsos (3 o 1ms) y la adición o no de un tratamiento de 10 segundos con AT.

Todos los embriones pertenecientes a este ensayo eran de la cepa B6D2F1/J y una vez electroporados, fueron cultivados hasta blastocistos, su ADN extraído, amplificado y secuenciado. La eficiencia de cada protocolo se analizó evaluando dos parámetros: el desarrollo embrionario a blastocisto y el porcentaje de mutantes. Con esto se buscó obtener un protocolo que permitiría obtener un número suficiente de embriones desarrollados con una tasa de mutación lo más alta posible.

La primera condición ensayada fue de pulsos de 3ms de duración con la inclusión de un tratamiento de los embriones con AT. Los valores de clivaje, desarrollo y eficiencia de mutación promedios para esta condición fueron de 60,1%, 25,0% y 44,1% respectivamente (Tabla 7, Anexo 2). Adicionalmente, de los 34 embriones analizados 2 fueron mosaicos y 2 presentaron 3 secuencias diferentes (Tablas 7 y 8). Otra condición ensayada fue de pulsos de 1ms de duración y el agregado de un tratamiento con AT. En promedio, el clivaje a dos células fue de 42,7%, un desarrollo a blastocisto de 17,0% y una eficiencia de mutación de 50,0% (Tabla 7, Anexo 2). De los 10 embriones mutados, 4 fueron mosaicos y 1 presentó 3 secuencias distintas (Tablas 7 y 8).

Por otro lado, se ensayaron las mismas condiciones, pero sin el tratamiento con AT. Para una duración de pulsos de 3ms, los valores de clivaje, desarrollo y eficiencia de mutación fueron de 42,3%, 16,4% y 69,7% respectivamente (Tabla 7, Anexo 2). Se obtuvieron para esta condición 4 embriones mosaicos y 6 que presentaron 3 secuencias (Tablas 7 y 8). Cuando la duración de los pulsos fue de 1 ms se obtuvo un clivaje de 44,6% y un desarrollo a blastocisto de 24,0% (Tabla 7, Anexo 2). El porcentaje de eficiencia de mutación de esta condición fue de 11,8% (Tabla 7, Anexo 2). De los 2 embriones mutantes, uno presentó mosaicismo (Tablas 7 y 8).

Todos los resultados de recuperación fueron altos, y se recuperó un promedio de 92,0% de los embriones electroporados. Este resultado muy ventajoso ya que pudiéndose electroporar hasta 50 embriones a la vez, se perderían únicamente 4 embriones en promedio por electroporación. Además, los porcentajes de sobrevivencia fueron altos, con un promedio de 95,0%. Esto significaría que el protocolo no generó un daño instantáneo en los embriones ensayados. Estos dos parámetros no fueron dependientes de la condición ensayada, ya que no se presentaron diferencias significativas entre los resultados de las condiciones ensayadas.

Los resultados de clivaje a dos células presentados por la condición contando con pulsos de 3ms de duración y la inclusión de un tratamiento con AT son significativamente mayores a los observados en las otras condiciones ($P=0,01$) e iguales al grupo control ($P=0,04$) (60,1%, Tabla 7). Este dato es importante, puesto que en la práctica los embriones electroporados o microinyectados se transfieren en etapa de cigoto o como embrión de dos células (54). Para la comparación de las eficiencias de los protocolos ensayados, se decidió considerar el desarrollo a blastocisto en el entendido que un número mayor de blastocistos *in vitro* puede estar relacionado a un mayor número de cría si estos embriones fuesen transferidos. Este parámetro no describió diferencias significativas entre los grupos evaluados, sin embargo, fue significativamente menor que el del grupo control. Se puede interpretar entonces que los protocolos ensayados afectaron el desarrollo embrionario en la misma medida.

Los embriones tratados con pulsos de 3ms (con y sin tratamiento con AT) y con pulsos de 1ms y tratamiento de AT, fueron mutados en una proporción similar. Los valores de eficiencia de estos grupos fueron de 44,1%, 69,7 y 50,0% respectivamente (Tabla 7) y no fueron significativamente distintos ($P<0,05$). El grupo sin tratamiento de AT y pulsos de 1ms tuvo una eficiencia de mutación de 11,8%, significativamente menor ($P<0,05$) al resto de los grupos.

La evaluación de la eficiencia de mutación puede ser complementada por el análisis de la presencia de mosaicismos y multiplicidad de secuencias en los embriones mutados. Definimos mosaicos como embriones en donde la secuencia *wild type* (WT) está sobrerrepresentada con respecto a la secuencia mutante. Esto puede deberse a que el corte y reparación del ADN se dio de manera posterior a la división del cigoto. En términos prácticos, un embrión con menor proporción de células mutantes tiene menor posibilidad de que estas células pasen a formar parte de la línea germinal y por lo tanto transmitan las mutaciones a la siguiente generación. Por otro lado, en los

embriones con múltiples secuencias, si bien el mecanismo por el que se obtiene podría ser el mismo (mutación luego de la primera división del embrión) el resultado es mucho más favorable puesto que la secuencia WT se encuentra en general representada en un porcentaje menor al 50% y aumenta la posibilidad de transmitir mutaciones. La presencia de mutaciones de este tipo fue analizada utilizando el *software* de Synthego Ice Analysis, (Tabla 8) y fue verificada de forma manual utilizando la plataforma Mega7.

El tratamiento con pulsos de 3ms y AT generó 44,1% de mutantes. De los 15 embriones mutantes, 4 presentaron más de dos secuencias, y ninguno contenía más de un 50,0% de secuencias WT (embriones 1, 5, 7 y 10, Tabla 8). Únicamente 3 embriones de 2 secuencias, presentaron una representación mayor al 50% de la secuencia WT (embriones 3, 8 y 9, Tabla 8). Del análisis de las mutaciones se desprende que en 11 de estos embriones hubo un corrimiento del marco de lectura que generaría un KO. De los 4 embriones con mutaciones que no corren el marco de lectura (embriones 1, 2, 8 y 11, Tabla 8), 2 de ellos contenían una secuencia que lo hacía.

La electroporación con pulsos de 1ms de duración y tratamiento con AT produjo exclusivamente embriones mosaicos o con secuencias múltiples, en todos los casos con porcentajes de secuencias WT mayores al 40,0%. Además, de los 10 embriones analizados, 6 de ellos presentaron mutaciones que no variaban el marco de lectura de la proteína (embriones 1, 2, 5, 7, 8 y 9, Tabla 8).

En el ensayo con pulsos de 3ms de embriones con ZP intacta se observó que 19 de los 22 embriones mutados fueron mosaicos o portadores de secuencias múltiples, sin embargo, solo 3 contaron con un porcentaje de secuencias WT alto (>50%, embriones 5, 8 y 11, Tabla 8). De los embriones mosaicos 7 presentaron secuencias que no corrían el marco de lectura proteico (embriones 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 15, Tabla 8), pero poseían en otra hebra una inserción/delección que si lo hacía.

Adicionalmente, 7 de estos embriones no presentaron secuencias WT (embriones 3, 4, 7, 10, 14, 17 y 21, Tabla 8).

Por último, al aplicar pulsos de 1ms a embriones con ZP intacta, los únicos 2 embriones mutantes obtenidos presentaron más de dos secuencia. En ambos casos la representación de secuencias WT fue menor al 50%. Uno de los dos embriones mutantes presentó una mutación que no corría el marco de lectura proteico.

Dado que el desarrollo a blastocisto no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, se eligió el protocolo de preferencia basándose en la eficiencia de mutación. En principio el tratamiento con pulsos de 1ms sin AT fue descartado ya que fue significativamente menor al resto. También se descartó el tratamiento de 1ms con tratamiento de AT puesto que presentó un número muy alto de mosaicos con una alta representación de la secuencia WT.

Los protocolos con pulsos de 3ms, no solo tuvieron una eficiencia de mutación comparable, sino que también fueron similares en cuanto a la presencia de mosaicos y secuencias múltiples. Como no se observó un beneficio claro del tratamiento con AT con esta duración de pulsos, se optó por eliminarlo del protocolo debido a la complejidad operacional que representa.

En resumen, las condiciones óptimas de electroporación en embriones B6D2F1/J producidos por FIV para el KO del gen *Clec4F* fueron: 10 pulsos de 3ms de duración, de 30V con 100ms de intervalo, sin tratamiento de AT y la adición de proteína Cas9 en una concentración de 250ng/μl y sgRNA a 300ng/μl.

Interesantemente se observaron mutaciones bialélicas (8,2%, Tabla 8) . Una mutación bialélica se presenta como la misma inserción/delección en ambas hebras. La eficiencia de mutaciones genéticas bialélicas inducidas por las técnicas de edición genética es baja. Takayama *et al.*

describieron que podía aumentarse la eficiencia de la recombinación homóloga bialélica en células madres pluripotentes inducidas, mediante la acción sinérgica de la sobreexpresión de RAD51 y la inclusión de un tratamiento con ácido valproico (68). Asimismo, Wilde *et al.*, demostraron que la adición de la proteína RAD51 en la microinyección de cigotos murinos, para la generación de ratones KO de los genes *Chd2* y *Tyr*, aumentaba dos veces la eficiencia de homocigosidad de la mutación. Los mecanismos de generación de mutaciones bialélicas no están profundamente dilucidados hasta el momento. No obstante, Wilde *et al.*, consiguieron demostrar que RAD51 promovía el mecanismo de reparación interhomólogo (69). Adicionalmente, la generación de este tipo de mutaciones mediante la microinyección de CRISPR-Cas9, durante la generación de ratones (B6D2F1/J) KO del gen *Clef4F*, fue nula (datos no publicados). Sería interesante explorar en un futuro la influencia de la electroporación en la generación de mutaciones bialélicas.

Los valores de eficiencias de mutación hallados con el protocolo seleccionado (69,7%) fueron mayores a los obtenidos con microinyección de esta misma guía (50,0%) (datos no publicados). Una optimización de las concentraciones de proteína Cas9 y sgRNA en la solución podría derivar en un aumento de la eficiencia de la mutación, pero no se consideró necesario realizarla dado que las eficiencias alcanzadas hasta este punto eran más que convenientes.

Tabla 7- Electroporación de embriones murinos de la cepa híbrida B6D2F1/J para la generación KO del gen Clec4F.

Condición	Porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ embriones electroporados)	Porcentaje de supervivencia (embriones vivos/ embriones recuperados)	Porcentaje de clivaje a dos células (embriones clivados/ embriones vivos)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos/embriones vivos)	Porcentaje de mutantes (mutantes/ embriones analizados)	Porcentaje de mosaicos (mosaicos/ mutantes)	Porcentaje de embriones que presentan 3 secuencias (embriones con 3 secuencias/ mutantes)
3ms, c/AT	95,98 (215/224) ^a	96,74 (208/215) ^a	60,10 (125/208) ^a	25,00 (52/208) ^b	44,12 (15/34) ^a	5,88 (2/34) ^a	5,88 (2/34) ^a
1ms, c/AT	94,30 (182/193) ^a	93,96 (171/182) ^a	42,69 (73/171) ^b	16,96 (29/171) ^b	50,00 (10/20) ^a	20,00 (4/20) ^a	5,00 (1/20) ^a
3ms, s/AT	96,30 (208/216) ^a	96,64 (201/208) ^a	42,29 (85/201) ^b	16,42 (33/201) ^b	69,70 (23/33) ^a	12,12 (4/33) ^a	18,18 (6/33) ^a
1ms, s/AT	96,84 (184/190) ^a	98,91 (182/184) ^a	44,57 (82/184) ^b	23,91 (44/184) ^b	11,76 (2/17) ^b	5,88 (1/17) ^a	0,00 (0/17) ^a
Control	-	-	90,83 (99/109) ^a	76,47 (91/119) ^a	0,00 (0/1)	0,00 (0/1)	0,00 (0/1)

Se mantuvieron constantes los siguientes parámetros de electroporación: 10 pulsos de 30V con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/μl de proteína Cas9 y 300ng/μl de la sgRNA. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 8- Mutaciones en cigotos murinos obtenidas mediante la electroporación de CRISPR-Cas9.

Condición	Eficiencia de mutación (%)	Embrión	sgRNA	PAM	Mutación	Traducción
Control	-	-	ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		WT (100,00%)	GLGPKSAALMAPRTL RHVQ
3ms, c/AT	44.12	1	ACCTGG ----- GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG ----- AGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 19 pb del 7 pb WT(25.70%)	GLGPKSAALMAPR----- GLGPKSAALMAPCGTSR
		2	ACCTGGACGTGCCGCAGG ----- GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 7 pb WT(24.60%)	GLGPKSAALMAPCGTSR
		3	ACCTGGACGTGCCGCAGGG ----- GCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 8 pb WT(66.80%)	GLGPKSAALMAPAARPG
		4	ACCTGGACGTGCCGCAGG ----- GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 7 pb WT(52.00%)	GLGPKSAALMAPCGTSR
		5	ACCTGGACGTGCCGC ----- CTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 6 pb ins 1 pb WT(15.80%)	GLGPKSAALMAPR--RHVQ GLGPKSAALMAPRXPAAARPG
		6	ACCTGGACGTGCCGCAGG ----- GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 7 pb WT(11.30%)	GLGPKSAALMAPCGTSR
		7	ACCTGGACGTGCCGCAGGG ----- AGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCG ----- TGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG ----- AGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 7 pb del 17 pb del 8 pb WT(12.50%)	GLGPKSAALMAPCGTSR GLGPKSAALTARPG----- GLGPKSAALMAPAARPG
		8	ACCTGGACGTGCCGCAGGGT NNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		ins 3 pb WT(78.80%)	GLGPKSAALMAPRXTLRHVQ
		9	ACCTGGACGTGCCGCAGGG -CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 1 pb WT(77.00%)	GLGPKSAALMAPRPCGTSR
		10	ACCTGGACGTGCCGCAGG ----- GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCT ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 7 pb ins 1 pb WT(31.10%)	GLGPKSAALMAPCGTSR GLGPKSAALMAPRXPAAARPG
		11	ACCTGGACGTGCC ----- TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG		del 9 pb bialélica	GLGPKSAALMAPR---HVQ
		12	ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCT		ins 1 pb	GLGPKSAALMAPRXPAAARPG

			ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 1 pb	GLGPKSAALMAPRPCGTSR
		13	ACCTGGACGTGCCGCAGGGNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb del 1 pb	GLGPKSAALMAPRXPAAARPG GLGPKSAALMAPRPCGTSR
		14	ACCTGGACGTGCCGCAGGGNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCT ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb WT(36.60%)	GLGPKSAALMAPRXPAAARPG
		15	ACCTGGACGTGCCGCAGGGNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb WT(42.00%)	GLGPKSAALMAPRXPAAARPG
1ms, c/AT	50.00	1	ACCTGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 19 pb WT(57.40%)	GLGPKSAALMAPR-----
		2	ACCTGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 19 pb WT(58.10%)	GLGPKSAALMAPR-----
		3	ACCTGGACGTGCCGCAGGGT-----CCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 8 pb WT(52.80%)	GLGPKSAALMDPAARPG
		4	ACCTGGACGTGCCGCAGGGNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb WT(47.30%)	GLGPKSAALMAPRXPAAARPG
		5	ACCTGGACGTGCC-----TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 9 pb WT(40.00%)	GLGPKSAALMAPR---HVQ
		6	ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb WT(66.70%)	GLGPKSAALMAPCGTSR
		7	ACCTGGACGTGCCGCAGGG--TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 3 pb WT(83.10%)	GLGPKSAALMAP-TLRHVQ
		8	ACCTGGACGTGCC-----TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 9 pb del 7 pb WT(51.40%)	GLGPKSAALMAPR---HVQ GLGPKSAALMAPCGTSR
		9	ACCTGGACGTGCCGC-----ATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 15 pb WT(76.00%)	GLGPKSAALM-----RHVQ
		10	ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb WT(82.60%)	GLGPKSAALMAPCGTSR
3 ms, s/AT	73.33	1	ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb WT(44.40%)	GLGPKSAALMAPCGTSR
		2	ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 6 pb del 7 pb WT(44.40%)	GLGPKSAALMAP--LRHVQ GLGPKSAALMAPCGTSR
		3	ACCTGGACGTGCCGCAGGGNNNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 3 pb del 1 pb	GLGPKSAALMAPRXTLRHVQ GLGPKSAALMAPRPCGTSR

		ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb	GLGPKSAALMAPR XP AARPG
4		ACCTGG-----TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGC-----CTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 16 pb ins 1 pb del 6 pb	GLGPKSAALMAP TR ----- GLGPKSAALMAPR XP AARPG GLGPKSAALMAPR--RHVQ
5		ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb WT(84.30%)	GLGPKSAALMAPR XP AARPG GLGPKSAALMAPRTL RHVQ
6		ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG-----AGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb del 8 pb WT(35.60%)	GLGPKSAALMAP CG TSR GLGPKSAALMAP AAR PG
7		ACCTGGACGTGCCGCAGGG-----AGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGC-----CTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCC-----CCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 16 pb del 6 pb del 16 pb	GLGPKSAAP CG TSR GLGPKSAALMAPR--RHVQ GLGPKSAAHGARPG
8		ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb WT(86.30%)	GLGPKSAALMAPR XP AARPG
9		ACCTGGACGTGCC-----TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 9 pb del 7 pb WT(24.30%)	GLGPKSAALMAPR---HVQ GLGPKSAALMAP CG TSR
10		ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 2 pb ins 1 pb	GLGPKSAALMAPR XP CGTSR GLGPKSAALMAPR XP AARP
11		ACCTGGACGTGCCGCAGG-----AGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 8 pb WT(75.20%)	GLGPKSAALMAP AAR PG
12		ACCTGGACGTGCCGCAGGG-----GAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 16 pb del 7 pb WT(31.30%)	GLGPKSAAP CG TSR GLGPKSAALMAP CG TSR
13		ACCTGGACGTGCC-----ATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 17 pb WT(47.10%)	GLGPKSAALMAPR PG -----
14		ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 1 pb WT(25.90%)	GLGPKSAALMAPR PC TSR
15		ACCTGGACGTGCCGC-----CTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 6 pb del 7 pb	GLGPKSAALMAPR--RHVQ GLGPKSAALMAP CG TSR
16		ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb del 1 pb WT(20.50%)	GLGPKSAALMAPR XP AARP GLGPKSAALMAPR PC TSR
17		ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb del 1 pb	GLGPKSAALMAP CG TSR GLGPKSAALMAPR PC TSR

			ACCTGGACGTGCCGCAGGGT-CTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 1 pb	GLGPKSAALMAPRPCGTSR
		18	ACCTGGACGTGC-----TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 10 pb del 1 pb WT(12.10%)	GLGPKSAALMAPSTSR GLGPKSAALMAPRPCGTSR
		19	ACCTGGACGTGC-----AGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 23 pb bialélica	GLGPKSAAARPG-----
		20	ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb bialélica	GLGPKSAALMAPCGTSR
		21	ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGG-CCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb del 1 pb	GLGPKSAALMAPRXPAAARP GLGPKSAALMAPRPCGTSR
		22	ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb bialélica	GLGPKSAALMAPRXPAAARP
1ms, s/AT	11.76	1	ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCC-----TGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	ins 1 pb del 9 pb WT(39.70%)	GLGPKSAALMAPRXPAAARP GLGPKSAALMAPR---HVQ
		2	ACCTGGACGTGCCGCAGG-----GAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG ACCTGGACGTGCCGCAGGGTCTGGGAGCCATGAGAGCAGCTGACTTAGGCCCCAGTCCTG	del 7 pb ins 1 pb WT (4.80%)	GLGPKSAALMAPCGTSR GLGPKSAALMAPRXPAAARP

Se mantuvieron constantes los siguientes parámetros de electroporación: 10 pulsos de 30V con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/μl de proteína Cas9 y 300ng/μl de la sgRNA. Las secuencias *target* del sgRNA se representan en naranja y aquellas cercanas a esta en azul, en *bordeaux* se demuestra la secuencia PAM, los nucleótidos deletados se representan como guiones verdes y aquellos insertados como Ns de color verde. La columna Mutación resume el genotipo encontrado para cada embrión mutado y aquella titulada Traducción describe la secuencia aminoacídica. En esta última, aquellos aminoácidos introducidos por un cambio en el marco de lectura se encuentran en verde y aquellos deletados se presentan como guiones verdes.

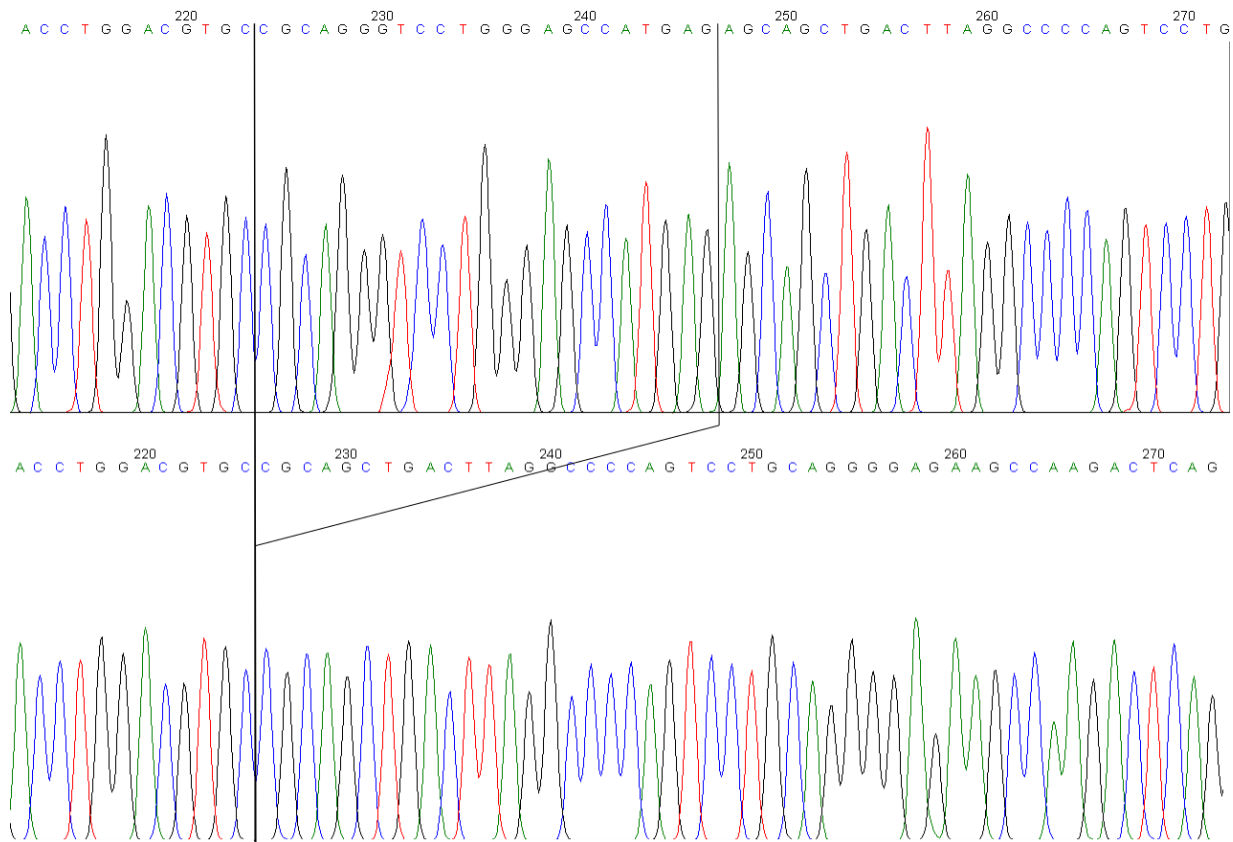


Figura 12- Ejemplificación de una secuencia, en este caso del embrión número 19 de la condición 3ms s/AT, que presentó una deleción bialélica idéntica de 23 nt.

4.4. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL PROTOCOLO EN EMBRIONES DE LA CEPA C57BL/6

Con el objetivo de evaluar la capacidad del protocolo escogido para generar KO del gen *Clec4F*, en otra cepa de embriones murinos, se efectuó un ensayo con embriones de la cepa C57BL/6 (línea murina consanguínea). Los embriones fueron aislados, electroporados y cultivados a blastocistos. El ADN de los mismos fue extraído y se analizó la presencia de mutaciones por secuenciación.

Los resultados de recuperación y sobrevida embrionaria obtenidos en este ensayo fueron de 90,4% y 81,4% (Tabla 9) y son comparables con los obtenidos en embriones B6D2F1/J. Esto refuerza aún más la conclusión extraída del ensayo anterior, los parámetros de recuperación y sobrevida embrionaria, posterior a la electroporación, son independientes de los parámetros de electroporación utilizados.

El grupo control presentó un clivaje a dos células y un desarrollo a blastocisto de 56,7% y 40,0% (Tabla 9). Estos resultados son bajos en comparación con los obtenidos con el control utilizando embriones de la cepa híbrida ($P < 0,05$). Sin embargo, estos resultados fueron válidos ya que son similares a los hallados en ensayos efectuados en las mismas condiciones con esta misma cepa por la Unidad de Animales Transgénicos del Institut Pasteur de Montevideo (datos no publicados).

Adicionalmente, se obtuvo un porcentaje de clivaje de 44,6% (Tabla 9, Anexo 3), valor que no difiere significativamente de los obtenidos en el ensayo anterior ($P < 0,05$, Tabla 7), indicando que el clivaje a dos células de los embriones de ambas cepas se vio afectado de igual forma. De los 92 embriones vivos posterior a la electroporación, 6 desarrollaron a blastocisto, obteniéndose un resultado de un 6,5% de desarrollo a blastocisto (Tabla 9, Anexo 3). Esta cifra fue aproximadamente 10% menor a la obtenida usando el mismo protocolo, en embriones de la cepa híbrida. Se pudo interpretar que los embriones pertenecientes a la cepa B6D2F1/J, son más resistentes a la electroporación con CRISPR-Cas9, obteniendo un desarrollo mayor. Otros autores demostraron que los embriones híbridos son más resistentes que los embriones C57BL/6 (70).

Se obtuvo un valor de eficiencia de mutación de 85,7% ya que, de los 7 embriones analizados, 6 presentaron mutaciones (Tabla 9, Anexo 3). Esta cifra no fue significativamente diferente a la obtenida con este protocolo para la cepa híbrida (69,7%, para un $P < 0,05$, Tabla 7). De los 6 embriones mutantes, únicamente 2 presentaron una secuencia WT (embriones 2 y 4, Tablas 9 y

10). No obstante, la secuencia WT representó menos 50% del total de las secuencias (Tabla 10). Adicionalmente, solo uno de estos embriones no corría el marco de lectura proteico. Los otros 4 embriones mutantes, poseían mutaciones bialélicas (embriones 1, 3, 5 y 6, Tabla 10). Por último, 3 de estos embriones presentaron mutaciones que modificaban el marco de lectura aminoacídico (Tabla 10).

La cepa murina C57BL/6 suele ser la preferida por los investigadores para los experimentos con modelos murinos genéticamente modificados. Es por esto que la obtención de los modelos en una línea diferente requiere la posterior retrocruza de los animales para cambiar su fondo genético. Este es un proceso largo y requiere la generación de muchos animales intermedios que no serán usados, además de generar la necesidad de genotipar cada camada. De ahí la pertinencia de evaluar la factibilidad de nuestro protocolo de electroporación en este fondo genético. A partir de este ensayo, se puede concluir que el protocolo seleccionado como óptimo es capaz de generar KO del gen *Clec4F* de una forma eficiente para embriones murinos de la cepa C57BL/6.

Tabla 9- Electroporación de embriones murinos de la cepa C57BL/6, para la generación KO del gen Clec4F.

Grupo	Porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ embriones electroporados)	Porcentaje de supervivencia (embriones vivos/ embriones recuperados)	Porcentaje de clivaje a dos células (embriones clivados/ embriones vivos)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos/embriones vivos)	Porcentaje de mutantes (mutantes/ embriones analizados)	Porcentaje de mosaicos (mosaicos/ mutantes)	Porcentaje de embriones que presentan 3 secuencias (embriones con 3 secuencias/ mutantes)
Condición	90,40 (113/125)	81,42 (92/113)	44,57 (41/92)	6,52 (6/92)	85,71 (6/7)	50,00 (3/6)	0,00 (0/6)
Control	-	-	56,67 (17/30)	40,00 (12/30)	-	-	-

Los parámetros de electroporación utilizados fueron los siguientes: 10 pulsos de 30V de 3ms de duración, con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/μl de proteína Cas9 y 300ng/μl de la sgRNA.

Tabla 10- Mutaciones en cigotos murinos obtenidas mediante la electroporación de CRISPR-Cas9 en embriones de la cepa C57BL/6.

Embrión	sgRNA PAM	Mutación	Traducción
	GAATGACCTGGACGTGCCGCAGGGTCCTGGGAGCCATGAGAGCAGC	WT	AALMAPRTL RHVQVI
1	GAATGACCTGGACGTGCC ----- TGGGAGCCATGAGAGCAAGCT	del 9 pb bialélica	AALMAPR --HVQVI
2	GAATGACCTGGACGTGCCGCAGGGTNNNNNNNNNNNNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGC	ins 12 pb (46,0%)	AALMAPRXXXXTLRHVQVI
3	GAATGACCTGGACGTGCCGCAGG ----- AGCCATGAGAGCAGC	del 8 pb bialélica	AALMAPAARPGH
4	GAATGACCTGGACGTGCCGCAGG -- CCTGGGAGCCATGAGAGCAGC	del 2 pb (4,00%) WT (10,00%)	AALMAPRPAARPGH
5	GAATGACCTGGACGTGCCGCAGGG ----- AGCCATGAGAGCAGC	del 7 pb bialélica	AALMAPCGTSRSF
6	GAATGACCTGGACGTGCCGCAGGGTNCCTGGGAGCCATGAGAGCAGC	ins 1 pb bialélica	AALMAPRXPAAARPGH

Los parámetros de electroporación utilizados fueron los siguientes: 10 pulsos de 30V de 3ms de duración, con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/μl de proteína Cas9 y 300ng/μl de la sgRNA. Las secuencias *target* del sgRNA se representan en naranja y aquellas cercanas a esta en azul, en *bordeaux* se demuestra la secuencia PAM, los nucleótidos deletados se representan como guiones verdes y aquellos insertados como Ns de color verde. La columna Mutación resume el genotipo encontrado para cada embrión mutado y aquella titulada Traducción describe la secuencia aminoacídica. En esta última, aquellos aminoácidos introducidos se encuentran en verde y aquellos deletados se presentan como guiones verdes.

4.5. EVALUACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA GENERACIÓN DE INSERCIONES PEQUEÑAS

Con el objetivo de evaluar la capacidad del protocolo seleccionado de generar otro tipo de modificaciones, se decidió efectuar un ensayo para la generación de KIs en embriones de la cepa B6D2F1/J.

Una gran ventaja de la edición genómica es la posibilidad de efectuar mutaciones dirigidas. Estas no sólo permiten la generación de organismos KO al generar DSBs que se reparan mediante el mecanismo NHEJ, sino que también al adicionar un molde de ADN se logra la inserción de secuencias en lugares específicos del genoma. Éstas secuencias pueden ser de un rango muy variado de tamaño desde mutaciones puntuales hasta la inserción de genes (71). La electroporación de moldes de ADN ha sido probada con ssODNs de hasta 200pb que permiten la inserción de hasta 150pb aproximadamente (66).

Para determinar si nuestro protocolo sirve para la generación de este tipo de KIs, se ensayó la inserción de un sitio loxP en el intrón 2 del gen murino CCAR2 (Figura 13). Los sitios lox-P, se conforman de dos secuencias pequeñas de 34 pb cada una, y forman parte del sistema Cre-loxP, utilizado como herramienta en diversas áreas como genética y biología celular. Este sistema permite controlar espacial y temporalmente la expresión génica, de una forma simple (72). En nuestro caso, la elección del gen e inserto en cuestión se debió a que teníamos experiencia previa en la generación de esta mutación y conocíamos las eficiencias obtenidas mediante microinyección.



Figura 13- Secuencia perteneciente al intrón 2 del gen CCAR2. La secuencia reconocida por el sgRNA se encuentra en naranja y la secuencia PAM en marrón.

Durante este ensayo, se utilizó el protocolo seleccionado como óptimo en los ensayos anteriores. Los parámetros de electroporación utilizados fueron los siguientes: 10 pulsos de 30V con 100ms de intervalo entre pulsos, y la adición de proteína Cas9 a 250ng/μl y sgRNA a 300ng/μl. Adicionalmente, se incluyó como molde para la RH, un ssODN a 600ng/μl, basándose en las concentraciones usadas por otros autores (39,51).

Todos los embriones pertenecientes a este ensayo fueron de la cepa B6D2F1/J. Una vez electroporados y cultivados hasta blastocistos el ADN fue extraído y la región de interés fue amplificada por PCR. Por último, se analizó la presencia de mutaciones por secuenciación.

Los resultados de recuperación y supervivencia embrionaria fueron similares a los obtenidos en los otros ensayos de electroporación efectuados en este proyecto (94,0 y 95,3% respectivamente, Tabla 11). El grupo control presentó un clivaje a dos células y un desarrollo a blastocisto de 80,0% en ambos casos (Tabla 11). Para los embriones electroporados, el clivaje promedio fue de 78,6% (Tabla 11, Anexo 4), y el desarrollo a blastocisto promedio de 41,1% (Tabla 11, Anexo 4), cifras que no difieren significativamente con los resultados hallados en los ensayos para KO en embriones de la misma cepa (Tabla 7). Esto era de esperarse dado que la presencia de ssODN en la mezcla de electroporación no debería de por sí aumentar la toxicidad del proceso.

Se obtuvo un porcentaje mutacional de 100% ya que, de los 15 embriones secuenciados, todos presentaron secuencias mutantes (Tabla 11). De los mutantes observados, dos de ellos mostraron mutaciones bialélicas que corren el marco de lectura (embriones 3 y 10, Tabla 12). Adicionalmente, 46,7% de los embriones contenían 3 secuencias (embriones 2, 4, 7, 8, 11, 12 y 15, Tablas 11 y 12). No obstante, todos contenían 1 o 2 secuencias que no variaban el marco de lectura de la proteína. Únicamente, 3 de los 15 embriones mutantes presentaron mutaciones que no variaban el marco de lectura (embriones 1, 5 y 13, Tabla 12). Oportunamente, 3 embriones presentaron la inserción del sitio loxP, aunque en baja proporción (1,0 o 2,0%, embriones 7, 15 y 9, Tabla 12).

Mientras que este protocolo no consiguió la generación de mutaciones de tipo KI en una alta eficiencia, demostró excelentes resultados para la generación de KO. Es posible que la falta de inserción del molde sea debido a su imposibilidad de entrar a la célula por falta de un tratamiento de los embriones con AT. Trö *et al.* obtuvieron una alta eficiencia de inserción de un sitio de restricción para la enzima BsaI en el gen *Nphs2*, utilizando condiciones de electroporación muy similares. Este protocolo se diferenció del utilizado en este ensayo, únicamente por la utilización de 2 pulsos en vez de 10. Estos autores presentaron eficiencias de inserción de 50,0% y un porcentaje de desarrollo a blastocisto menor al 44,0%, demostrando que el tratamiento de los embriones con AT no es necesario para la generación de inserciones pequeñas (40). Mediante la técnica de microinyección se obtuvo una eficiencia de generación de KI de 7,1%, por lo que no se recomendaría la sustitución de la técnica en este caso (datos no publicados).

Tabla 11- Electroporación de embriones murinos de la cepa C57BL/6, para la generación KI de un sitio lox-P en el gen CCAR2.

Condición	Porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ embriones electroporados)	Porcentaje de supervivencia (embriones vivos/ embriones recuperados)	Porcentaje de clivaje a dos células (embriones clivados/ embriones vivos)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos/ embriones vivos)	Porcentaje de mutantes (mutantes/ embriones analizados)	Porcentaje de mosaicos (mosaicos/ mutantes)	Porcentaje de embriones que presentan 3 secuencias (embriones con 3 secuencias/ mutantes)
3ms, s/AT	94,00 (188/200)	95,30 (179/188)	78,62 (140/179)	41,10 (89/179)	100,00 (15/15)	0,00 (0/15)	46,67 (7/15)
Control	-	-	80,00 (16/20)	80,00 (16/20)	0,00 (0/1)	0,00 (0/1)	0,00 (0/1)

Los parámetros de electroporación utilizados fueron los siguientes: 10 pulsos de 30V, de 3ms de duración, con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/μl de proteína Cas9, 300ng/μl de la sgRNA y 600ng/μl de ssODN.

Tabla 12- Mutaciones en cigotos murinos obtenidas mediante la electroporación de CRISPR-Cas9 en embriones de la cepa híbrida.

Embrión	sgRNA PAM	Mutación
WT	GAGGATCTTATAAACCCAGAGGTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	WT
1	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6 pb WT (3,00%)
2	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG - CTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6pb del 1 pb WT (5,00%)
3	GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	ins 1 pb bialélica
4	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6pb ins 1 pb WT (16,00%)
5	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- CTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 9 pb del 6 pb
6	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6pb ins 1 pb
7	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATGAAAATTCGAC	del 6pb ins 1 pb ins loxP (1,00%)
8	GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG - CTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	ins 1 pb del 6pb del 1 pb
9	GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATGAAAATTCGAC	ins 1 pb

		ins loxP (2,00%)
10	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG - CTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 1 pb bilalélica
11	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG -- TAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6pb ins 2 pb del 2 pb
12	GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNNNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	ins 1 pb ins 3 pb ins 2 pb
13	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGGTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6 pb WT (30,00%)
14	GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- TGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG ----- GCTCCAATCAGCTACTCAGAC	del 6pb del 8 pb
15	GAGGATCTTATAAACCCAGAGGNTCTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAAACCCAGAGG - CTAGGTGGCTCCAATCAGCTACTCAGAC GAGGATCTTATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATGAAAATTCGAC	ins 1 pb del 1 pb ins loxP (2,00%)

Los parámetros de electroporación utilizados fueron los siguientes: 10 pulsos de 30V, de 3 ms de duración, con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/μl de proteína Cas9, 300ng/μl de la sgRNA y 600 ng/μl de ssODN. Las secuencias *target* del sgRNA se representan en naranja y aquellas cercanas a esta en azul, en *bordeaux* se demuestra la secuencia PAM, los nucleótidos deletados se representan como guiones verdes y aquellos insertados como Ns de color verde. La columna Mutación resume el genotipo encontrado para cada embrión.

5. CONCLUSIONES

Durante esta tesis se efectuó la puesta a punto de un protocolo para la generación de ratones genéticamente modificados mediante la electroporación de CRISPR-Cas9 en cigotos murinos, en un estadio de preimplantacional de una célula.

En primer lugar, se optimizó el tiempo de tratamiento con AT de los cigotos a electroporar. Concluyendo que este era de 10 segundos con una solución de AT casera. Utilizando estas condiciones se pudo degradar un porcentaje de la ZP lo suficientemente alto para permitir el ingreso de las RNPs, pero aún permitiendo la sobrevivencia y desarrollo del embrión.

Además, se determinó el protocolo óptimo para la generación de embriones KO del gen *Clec4F*, una lectina de tipo C, con capacidad de unión a carbohidratos expresada en macrófagos hepáticos. Este se determinó mediante ensayos de electroporación experimentando cuatro condiciones diferentes y evaluando la eficiencia del protocolo tomando como parámetros esenciales el desarrollo a blastocisto de los embriones y la eficiencia de mutación. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron una electroporación de 10 pulsos de 30V, con una duración de 3ms y un intervalo entre pulsos de 100ms, y concentraciones de RNPs de 250ng/μl de proteína Cas9 y 300ng/μl de sgRNA. Estas fueron determinadas con embriones de la cepa híbrida B6D2F1/J, obteniéndose un desarrollo a blastocisto de 16,4% y uno de eficiencia de mutación de 70,0%. Este último porcentaje fue mayor al obtenido mediante la técnica de microinyección (50,0%), indicando que la electroporación podría reemplazar a la microinyección al ser más rápida, simple, eficiente y barata.

Por otro lado, se probó que este protocolo puede ser usado para generar embriones KO para el mismo gen en la cepa consanguínea C57BL/6J. Se obtuvo para esta cepa un porcentaje de desarrollo a blastocisto de 6,5%, indicando que los embriones de la cepa consanguínea fueron menos resistentes al protocolo de electroporación que los híbridos, y una eficiencia de mutación de 85,7%.

Por último, se intentó generar con el protocolo seleccionado como óptimo, pequeñas inserciones en embriones de la cepa híbrida. Si bien no fue posible la generación de un KI de un sitio loxP en el gen CCAR2 con una alta eficiencia, se obtuvieron resultados de desarrollo y eficiencia de mutación de KO de 41,1% y 100,0% respectivamente.

La eficiencia de este protocolo puede variar según otros parámetros como la calidad de los reactivos, sin embargo, para un mismo sgRNA, probó ser más eficiente, más económica y mucho más rápida que la microinyección.

5.1. PERSPECTIVAS

Culminado este proyecto, queda pendiente realizar un estudio más exhaustivo de la generación de embriones KO en la cepa consanguínea C57BL/6J para determinar la necesidad o no de modificar parámetros de electroporación que aumenten la supervivencia y desarrollo de los embriones. Adicionalmente, sería interesante continuar con ensayos para obtener pequeñas inserciones, por ejemplo, sumando un tratamiento con AT que podría aumentar la entrada del ssODN a las células.

Por otro lado, se observó una alta generación de mutaciones bialélicas mediante la generación de embriones KO. Esto no fue el caso durante la microinyección de CRISPR-

Cas9 para la generación de ratones KO de los mismos genes. Sería interesante explorar en un futuro si la electroporación favorece este tipo de mutaciones y su mecanismo.

Finalmente, se deberá evaluar la capacidad de los embriones obtenidos de generar una línea genéticamente modificada, mediante transferencia de los mismos a hembras receptoras y la posterior evaluación de la transmisión de la mutación.

La herramienta desarrollada representa un recurso novedoso, más sencillo, rápido y barato que la microinyección. Su utilización permitiría obtener de forma más eficiente modelos murinos modificados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Menchaca A, Schlapp G, Meikle M, Crispo M. Transgenesis and Gene Edition in Mammals. Elsevier. 2017.
2. Muntaha S, Ahmed A, Ahmed K, Mukhtar N, Naureen U, Murtaza M, Hussain T. Applications and Future Prospects of Genetic Engineering: a New Global Perspective. *Fuuast J Biol.* 2016;6(2):201–209.
3. Crispo M, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Barrera N, Mulet AP, Nguyen TH, Anegón I, Menchaca A. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res.* 2015;24(1):31–41.
4. Siddiqui A, Jagdale P, Ahire K, Jadhav S, Khan SA, Bhosle S, Pal A, Jamdagni P, Chaudhari B. Relevance of small laboratory animals as models in translational research: Challenges and road ahead. *J App Pharm Sc.* 2016;6(5):198–209.
5. Baumgart AK, Beyer M. Genetic engineering as a tool for the generation of mouse models to understand disease phenotypes and gene function. *Curr Opin Biotech.* 2017;48:228–233.
6. Quimby F. *The Mouse in Biomedical Research.* 2da.ed. Elsevier Inc.; 2002.
7. Philips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Caskey CJ. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genet.* 1996;(12):18–19.
8. Adria A, Catalan N, Coyo A. *Bioética en experimentación Animal [tesis].* Facultad de Veterinaria (UAB);2012..

9. Gurumurthy CB, Lloyd KCK. Generating mouse models for biomedical research: technological advances. *Dis Model Mech.* 2019;12(1).
10. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: Perspectives for human-disease models. *Nat Cell Bio.* 2007;9(9):993–999.
11. Viney M, Lazarou L, Abolins S. The laboratory mouse and wild immunology. *Parasite Immunol.* 2014;37(5):267–273.
12. Reim D. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8va.ed. Washington, D.C. National Research Council Committees. 1996.
13. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros A. *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón.* Lima: Instituto Nacional de Salud; 2008.
14. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. *The Laboratory Mouse.* 2da.ed. CRC Press; 2011.
15. Gordon J, Ruddle F. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse Pronuclei. *AAAS.* 1981;214(4526):1244–1246.
16. Rossol T, Moore, R. The Need for Veterinarians in Biomedical Research. *J Vet Med Educ.* 2009; 36(5).
17. Zosky G. Animal models of asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 2007;18(37):973–988.
18. Ha S, Kim JH, Yang JW, Bae H, Cho HY, Park CK. Expression of DBC1 is associated with poor prognosis in hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2016;212(7):616–621.
19. López A, Gómez D, Domínguez MS, Mejías F, Fernández MJ, Dinant C, Martínez

- MI, Bartek J, Huertas P. A genome-wide screening uncovers the role of CCAR2 as an antagonist of DNA end resection. *Nat Commun.* 2016;7.
20. Kong S, Dong H, Jianxun S, Muthsamy T, Bellur P, Quan Q. Deleted in Breast Cancer 1 suppresses B cell activation through RelB and is regulated by IKK α phosphorylation. *J Immunol.* 2015;8(195):3685–3693.
21. Yang CY, Chen JB, Tsai TF, Tsai YC, Liang PH, Hsu TL, Wu CY, Netea M, Wong CH. CLEC4F Is an Inducible C-Type Lectin in F4/80-Positive Cells and Is Involved in Alpha-Galactosylceramide Presentation in Liver. *PLoS ONE.* 2013;8(6).
22. Taylor ME, Snelling T, Smith DF, Drickamer K. Absence of a human ortholog of rodent Kupffer cell galactose-binding receptor encoded by the CLEC4f gene. *Glycobiology.* 2018;29(4):332–345.
23. Carretero A, Ruberte J, Navarro M. *Morphological Mouse Phenotyping.* 1^a.ed. Editorial Medica Panamericana.; 2017.
24. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo.* 3a.ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003
25. Transgenic Mouse Core Facility, [Internet]. Friburgo (Alemania): Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetic [citado 2019 Aug 1]. Disponible desde: <https://www.ie-freiburg.mpg.de/transgenicmousefac>.
26. Palma G. *Biología de la reproducción.* 2da.ed. Machala: Palma; 2000.
27. Rankin T, Dean J. Preimplantation embryology: The molecular genetics of the zona pellucida: mouse mutations and infertility. *MHR.* 1996; 2(11):889–894.

28. Vandervoort A, Overstreet W, Cherr GN. Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *The Yale journal of biology and medicine*. 1985;59(409):14.
29. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biology Open*. 2016;5(8):1142–1148.
30. Luo C, Zuñiga J, Edison E, Dong W. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *JAALAS*. 2011;50(4):471–478.
31. Shaw RW. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: A brief overview. *The Yale journal of biology and medi*. 1985;61(719):847–847.
32. Mushtaq S, Daş YK, Aksoy A. Alternative Methods to Animal experiments. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2018;38(2):161–170.
33. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015;23(3):223–229.
34. Albus U. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8va.ed.. Laboratory Animals. 2012;46(3):267–268.
35. Zaman J, Khattak K, Rauf S, Anwar Z. Recent Advances in Genetic Engineering- A Review. *Curr Res J Biol Sci*. 2012;4:82–89.
36. Canseco RS, Sparks AE, Page RL. Gene transfer efficiency during gestation and the influence of co-transfer of non-manipulated embryos on production of transgenic mice.

Transgenic Research. 1994;3(1):20–25.

37. Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics*. 2007;31(2):159–173.

38. Cohen-Tannoudji M, Babinet C. Beyond 'knock-out'-mice: New perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *MHR*. 1998;4(10):929–938.

39. Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Ann Rev Microbiol*. 2015;69(1):209–228.

40. Tröder SE, Ebert LK, Butt L, Assenmacher S, Schermer B, Zevnik B. An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes. *PLoS ONE*. 2018;13(5):1–14.

41. Chen S, Lee B, Lee AYF, Modzelewski AJ, He L. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J Biol Chem*. 2016;291(28):14457–14467.

42. Khan SH. Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2019;16:326–334.

43. Petersen B, Niemann H. Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Rese*. 2015;24(3):381–396.

44. Joung JK, Sander JD. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(1):49–55.

45. Jansen R, Embden V, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are

associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565–1575.

46. Mojica FJM, Díez C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* 2000;36(1):244–246.

47. Mojica F, Ferrer C, Rodríguez F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol.* 1995;17(1):85–93.

48. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie.* 2015;117:119–128.

49. González IB. *Crispr Como Herramienta De Edición Genética Y Sus Aplicaciones En La Salud Humana* [tesis]. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 2016:1–20.

50. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2013;152(5):1173–1183.

51. Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL, Malhotra A, Geurts AM, Chen YG, Wang H. Efficient CRISPR/cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics.* 2015;200(2):423–430.

52. Zhao Y, Sun H, Sha X, Gu L, Zhan Z, Li WJ. A Review of Automated Microinjection of Zebrafish Embryos. *Micromachines.* 2018;10(1).

53. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated

genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910–918.

54. Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L, Zhang N, Zhu K, Xu J, Hu B. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;46(1):49-55.

55. Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):659–662.

56. Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*. 2014;24(3):372–375.

57. Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*. 2014;9(9):1–7.

58. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, et al. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE*. 2015;10(8):1–18.

59. Wang W, Kutny PM, Byers SL, Longstaff CJ, DaCosta MJ, Pang C, Zhang Y, Taft RA, Buaas FW, Wang H. Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes through a Series of Electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation. *J Gen Genomics*. 2016;43(5):319–327.

60. Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, Kotnik T, Miklavcic D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2014;16(1):295–320.

61. Scotzer C, Dunlap ME, Butler SP, Velander WH, Gwazdauskas FC. Development of murine embryos following electroporation. *J Assis Reprodu Gen.* 2003;20(4):148–152.
62. Weaver JC, Langer R, Potts RO. Tissue Electroporation for Localized Drug Delivery. *Chem. Ser.* 1995;(250):301–316.
63. Kaneko T, Mashimo T. Simple genome editing of rodent intact embryos by electroporation. *PLoS ONE.* 2015;10(11):1–7.
64. Schneider, CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ 25 years of image analysis. *Nat methods.* 2012;9(7): 671-675.
65. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Ev.* 2016;33(7):1870–1874.
66. Modzelewski AJ, Chen S, Willis BJ, Lloyd KCK, Wood JA, He L. Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nat Protoc.* 2018;13(6):1253–1274.
67. Schlapp G, Meikle M. Unidad de Animales Transgénicos del Institut Pasteur de Montevideo, comunicación personal.
68. Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Res.* 2017;45.
69. Wilde JJ, Aida T, Wienisch M, Zhang Q, Qi P, Feng G. RAD51 Enhances Zygotic Interhomolog Repair. *bioRxiv.* 2018.
70. Auerbach AB, Norinsky R, Ho W, Losos K, Guo Q, Chatterjee S, Joyner AL. Strain-

dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res.* 2003;12(1):59–69.

71. Ford K, McDonald D, Mali P. Functional genomics via CRISPR–Cas. *J Mol Biol.* 2018;431(1):48–65.

72. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current protocols in mouse biology.* 2017;7(1):1–12.

7. COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Como resultado de esta tesis se publicó un resumen y se presentó un póster. El material se adjunta a continuación.

CRISPR-CAS9 MURINE ZYGOTE ELECTROPORATION

Combining efficiency with animal reduction.

Elenter N., Mulet A P., Schlapp G., Meikle M N., Crispo M.
Transgenic and Experimental Animal Unit, Institut Pasteur de Montevideo Uruguay

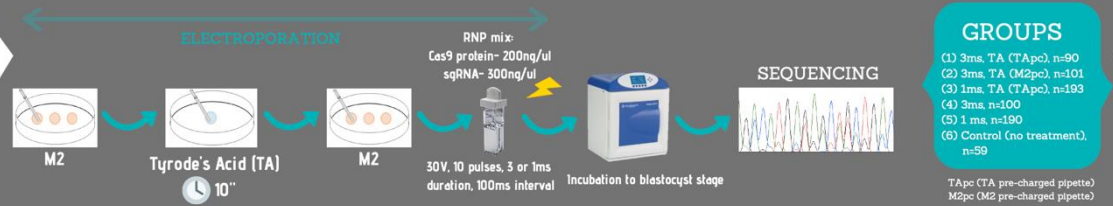
INTRODUCTION

The classic protocol to deliver CRISPR-Cas9 reagents for genome editing still relies on microinjection into mammalian zygotes; a process that remains laborious, costly, low throughput and with considerable technical barriers. Many transgenic facilities have switched to the use of electroporation systems and devices that proved to be very efficient in replacing the microinjection.

The aim of this study was to tune up the use of BTX-ECM-830 electroporator with 1mm cuvettes to obtain CRISPR-Cas9 modified mouse embryos, while reducing the number of female donors by using ultra-superovulation and *in vitro* fertilization.

METHODS

B6D2F1/J oocytes obtained by ultra-superovulation (Takeo and Nakagata, 2015) were *in vitro* fertilized using CARD kits.

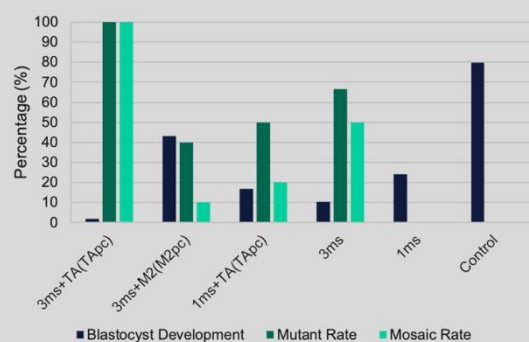


RESULTS

AFTER ELECTROPORATION

- Mean Recovery Rate: **92.5%**
- Mean Survival Rate: **95.6%**

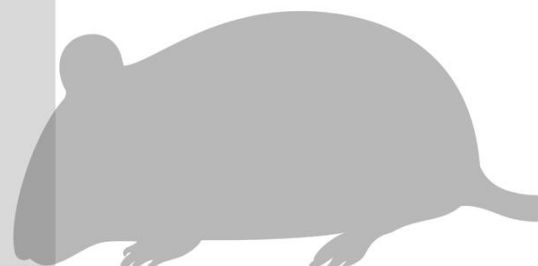
Blastocyst Development & Mutation efficiency



CONCLUSION

Pulse duration and zona *pellucida* integrity are critical electroporation parameters to achieve high embryo development and mutation efficiency rate.

Optimal conditions were 3ms pulses combined with and without TA treatment. We accomplished high mutation efficiency while reducing the number of animals used in the study.



CRISPR/Cas9 murine zygote electroporation: combining efficiency improvement with animal reduction

Nicole Elenter, Paula Ana Mulet, Geraldine Schlapp, Maria Meikle, Martina Crispo

Transgenic and Experimental Animal Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

The aim was to tune-up the use of BTX-ECM-830 electroporator with 1 mm cuvettes to obtain CRISPR/Cas9 edited mouse embryos. Additionally, we managed to reduce the number of female's embryo donors using ultra-superovulation and in vitro fertilization.

B6D2F1/J oocytes obtained from ultra-superovulation (Takeo and Nakagata, 2015) were in vitro fertilized using CARD kits. Three to seven hours later, the embryo's zona pellucida were partially degraded with acid tyrode's solution (AT) or remained intact. Immediately, 45-50 embryos per condition were electroporated with 10 pulses of 30 V during 1 or 3 ms with 100 ms interval between pulses. Embryos were incubated in M16 (37 °C, 5% CO₂) to blastocyst stage and DNA was extracted for sequencing.

Overall, the embryo recovery rate ranged from 73.3 to 97.0% and survival rate from 83.3 to 98.9%. Groups with 3 ms pulses presented lower two-cell development, with and without AT treatment (10.9 and 21.1%, respectively), compared to groups electroporated with 1 ms pulses (42.7 and 45.1%). Likewise, 3 ms pulses groups treated with or without AT showed lower blastocyst development (1.8% and 10.5%, respectively) than 1 ms groups (17.0% and 24.2%).

Critical electroporation parameters to achieve high embryo development are pulse duration and pellucid zone integrity. DNA modification analysis is required to determine efficiency rates.

8. ANEXO

8.1.ANEXO 1

Tabla 13- Medidas efectuadas de la ZP en embriones murinos de la cepa B6D2F1/J, luego de ser expuestos distintos tiempos de tratamiento con AT comercial.

Réplica	Duración del tratamiento	Embrión	Medida				Promedio
1	0	1	24.59	24.59	24.59	24.59	24.59
1	0	2	29.76	23.29	25.88	25.88	26.20
1	0	3	24.59	25.88	23.29	22.00	24.59
1	0	4	28.47	23.29	23.29	25.88	24.15
1	0	5	22.00	24.59	24.59	25.88	24.26
1	0	6	28.47	28.27	25.88	28.27	27.72
1	0	7	28.47	25.88	28.47	27.17	27.50
1	0	8	29.76	24.59	28.49	25.88	28.04
1	0	9	25.88	24.59	25.88	23.29	24.91
2	0	10	24.59	24.59	23.29	25.88	24.59
2	0	11	9.18	8.23	7.92	7.92	8.31
2	0	12	8.87	9.18	7.92	9.82	9.29
2	0	13	7.60	6.97	7.28	8.23	7.52
2	0	14	7.60	8.55	8.23	7.92	8.07
2	0	15	9.50	7.92	8.23	7.92	8.39
2	0	16	8.55	8.23	6.65	8.87	8.55
2	0	17	7.92	8.55	7.60	7.60	7.91
2	0	18	7.92	7.28	7.28	7.60	7.52
2	0	19	8.55	7.28	7.92	7.92	7.92
2	0	20	7.92	7.60	8.55	8.23	8.07
1	15	1	25.88	21.998	25.88	23.292	24.26
1	15	2	28.468	27.174	25.88	24.586	26.53

1	15	3	27.174	25.88	24.586	25.88	25.88
1	15	4	23.292	25.88	27.174	25.88	25.56
1	15	5	25.88	28.468	27.174	24.586	26.53
1	15	6	25.88	24.586	27.174	27.174	26.20
1	15	7	24.586	25.88	29.762	25.88	25.45
1	15	8	25.88	25.88	25.88	24.586	25.56
1	15	9	23.292	23.292	25.88	24.586	24.26
1	15	10	24.586	25.88	21.998	25.88	24.59
1	30	1	21.998	25.88	27.274	25.88	26.34
1	30	2	21.998	23.292	23.292	23.292	22.97
1	30	3	21.998	23.292	23.292	23.292	22.97
1	30	4	24.586	20.704	24.586	23.292	23.29
1	30	5	25.88	18.116	20.704	23.292	23.29
1	30	6	21.998	25.88	24.586	21.998	23.62
1	30	7	25.88	23.292	27.174	25.88	25.56
1	30	8	21.998	21.998	20.704	20.704	21.35
1	30	9	21.998	21.998	21.998	21.998	22.00
1	30	10	23.292	25.88	25.88	24.586	24.91
1	60	1	24.586	21.998	20.704	24.586	22.97
1	60	2	23.292	24.586	25.88	23.292	24.26
1	60	3	20.704	21.998	20.704	21.998	21.35
1	60	4	20.704	19.41	23.292	20.704	21.03
1	60	5	24.586	24.268	24.586	23.292	24.18
1	60	6	24.586	27.174	27.174	24.586	25.88
1	60	7	24.586	23.292	24.586	20.704	23.29
1	60	8	24.586	23.292	23.292	23.292	23.62
1	60	9	25.88	27.174	24.586	24.586	25.56
1	60	10	23.292	23.292	23.92	21.998	23.13
2	60	11	6.649	8.548	7.598	7.915	7.68
2	60	12	6.64	4.432	6.015	6.965	6.54
2	60	13	6.965	7.915	7.598	6.965	7.36

2	60	14	6.332	6.965	6.015	5.699	6.25
2	60	15	6.015	5.669	6.332	6.015	6.01
2	60	16	6.015	6.649	6.332	6.332	6.33
2	60	17	6.332	6.015	6.015	6.332	6.17
2	60	18	6.332	5.699	6.332	6.015	6.09
2	60	19	6.015	6.332	6.332	6.332	6.25
2	60	20	6.332	6.015	6.332	6.649	6.33
1	90	1	23.292	23.292	19.410	25.880	24.15
1	90	2	23.292	25.880	28.468	23.292	24.15
1	90	3	20.704	23.292	23.292	20.704	22.00
1	90	4	20.704	23.292	21.998	24.586	22.65
1	90	5	23.292	24.586	20.704	28.486	22.86
1	90	6	21.998	23.292	25.88	21.998	23.29
1	90	7	23.292	21.998	24.58	21.998	22.43
1	90	8	23.292	23.292	21.998	21.998	22.65
1	90	9	21.998	20.704	20.704	20.704	21.03
1	90	10	23.292	21.998	25.88	24.586	23.29
2	90	11	5.382	6.015	5.066	5.066	5.38
2	90	12	6.965	7.598	7.598	7.282	7.36075
2	90	13	6.015	7.282	6.649	6.649	6.65
2	90	14	7.282	7.598	7.915	7.598	7.59825
2	90	15	5.699	6.015	6.015	6.332	6.02
2	90	16	5.382	6.332	7.598	5.699	5.80
2	90	17	6.015	5.669	6.332	6.965	6.25
2	90	18	6.332	5.669	6.015	6.649	6.17
2	90	19	6.015	6.015	6.649	7.598	6.57
2	90	20	5.669	6.332	6.015	6.649	6.17

8.2.ANEXO 2

Tabla 14- Electroporación de embriones murinos de la cepa híbrida B6D2F1/J para la generación KO del gen Clec4F.

Condición	Grupo	Porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ embriones electroporados)	Porcentaje de sobrevivida (embriones vivos/ embriones recuperados)	Porcentaje de clivaje a dos células (embriones clivados/ embriones vivos)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos/embriones vivos)	Porcentaje de mutantes (mutantes/ embriones analizados)	Porcentaje de mosaicos (mosaicos/ mutantes)	Porcentaje de embriones que presentan 3 secuencias (embriones con 3 secuencias/ mutantes)
3ms, c/AT	1	95,05 (96/101)	98,96 (95/96)	78,95 (75/95)	43,16 (41/95)	36,84 (7/19)	0,00 (0/19)	10,53 (2/19)
	2	95,45 (63/66)	95,24 (60/63)	38,33 (23/60)	16,67 (10/60)	33,33 (3/9)	22,22 (2/9)	0,00 (0/9)
	3	98,25 (56/57)	94,96 (53/56)	50,94 (27/53)	1,89 (1/53)	83,33 (5/6)*	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
1ms, c/AT	1	91,40 (85/93)	89,41 (76/85)	40,79 (31/76)	14,47 (11/76)	30,00 (3/10)	10,00 (1/10)	0,00 (0/10)
	2	97,00 (97/100)	97,94 (95/97)	44,21 (42/95)	18,95 (18/95)	70,00 (7/10)	30,00 (3/10)	10,00 (1/10)
3ms, s/AT	1	97,00 (97/100)	97,94 (95/97)	21,05 (20/95)	10,53 (10/95)	70,00 (7/10)	0,00 (0/10)	30,00 (3/10)
	2	93,33 (56/60)	96,43 (55/56)	56,36 (31/55)	23,64 (13/55)	50,00 (7/14)*	28,57 (4/14)	21,43 (3/14)
	3	98,21 (55/56)	92,73 (51/55)	66,67 (34/51)	19,61 (10/51)	100,00 (9/9)	0,00 (0/9)	0,00 (0/9)
1ms, s/AT	1	94,44 (85/90)	98,82 (84/85)	91,67 (77/85)	50,00 (42/85)	11,76 (2/17)	5,88 (1/17)	0,00 (0/17)
	2	99,00 (99/100)	98,99 (98/99)	5,10 (5/98)	2,05 (2/98)	-	-	-

Se mantuvieron constantes los siguientes parámetros de electroporación: 10 pulsos de 30V con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/ul de proteína Cas9 y 300ng/ul de la sgRNA. Se varió la duración del pulso (3 o 1ms) y la adición o no de un tratamiento de 10 segundos con AT. *Se analizó el ADN de mórulas y blastocistos.

8.3.ANEXO 3

Tabla 15- Electroporación de embriones murinos de la cepa híbrida B6D2F1/J para la generación KO del gen Clec4F.

Réplica	Porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ embriones electroporados)	Porcentaje de sobrevida (embriones vivos/ embriones recuperados)	Porcentaje de clivaje a dos células (embriones clivados/ embriones vivos)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos/embriones vivos)	Porcentaje de mutantes (mutantes/ embriones analizados)	Porcentaje de mosaicos (mosaicos/ mutantes)	Porcentaje de embriones que presentan 3 secuencias (embriones con 3 secuencias/ mutantes)
1	82,93 (34/41)	64,71 (22/34)	0,00 (0/22)	0,00 (0/22)	-	-	-
2	94,05 (79/84)	88,61 (70/79)	58,57 (41/70)	8,57 (6/70)	85,71 (6/7)	50,00 (3/6)	0,00 (0/6)

Se mantuvieron constantes los siguientes parámetros de electroporación: 10 pulsos de 30V con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/ul de proteína Cas9 y 300ng/ul de la sgRNA. Se varió la duración del pulso (3 o 1ms) y la adición o no de un tratamiento de 10 segundos con AT.

8.4.ANEXO 4

Tabla 15- Electroporación de embriones murinos de la cepa híbrida B6D2F1/J para la generación del KI de un sitio loxP.

Réplica	Porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ embriones electroporados)	Porcentaje de supervivencia (embriones vivos/ embriones recuperados)	Porcentaje de clivaje a dos células (embriones clivados/ embriones vivos)	Porcentaje de desarrollo a blastocisto (blastocistos/embriones vivos)
1	100,00 (50/50)	90,00 (45/50)	88,89 (40/45)	72,50 (29/40)
2	94,00 (47/50)	100,00 (47/47)	55,32 (26/47)	23,08 (6/26)
3	92,00 (46/50)	96,65 (44/46)	79,55 (35/44)	50,00 (22/44)
4	90,00 (45/50)	95,56 (43/45)	90,70 (39/43)	37,20 (16/43)

Se mantuvieron constantes los siguientes parámetros de electroporación: 10 pulsos de 30V con un intervalo de 100ms entre pulsos. Las concentraciones de RNPs utilizadas fueron 250ng/ul de proteína Cas9, 300ng/ul de la sgRNA y 600 ng/ul de ssODN.