



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

La inserción de EGFP en el cromosoma Y de ratón revela una expresión y transmisión inesperada del transgén

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción

AUTOR/A: Fons Contreras, Maria

Tutor/a: Ibáñez Escriche, Noelia

Cotutor/a externo: GUTIERREZ ADAN, ALFONSO

Director/a Experimental: PERICUESTA CAMACHO, EVA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona



**MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

Promoción 2020/2022

Tesis de fin de máster

**La inserción de eGFP en el cromosoma Y de ratón (*Mus musculus*)
revela una expresión y transmisión inesperada del transgén**

Autor/a:

MARÍA FONS CONTRERAS

Madrid, junio de 2022



**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA
Y ALIMENTARIA**

Departamento de reproducción animal

**La inserción de eGFP en el cromosoma Y de ratón (*Mus musculus*)
revela una expresión y transmisión inesperada del transgén**

Directores:

DR. ALFONSO GUTIÉRREZ ADÁN

DRA. EVA PERICUESTA CAMACHO

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 El cromosoma Y del ratón.....	3
1.2 Expresión de cromosomas sexuales	4
1.3 Producción de transgénicos en el cromosoma Y.....	5
1.4 Modelos transgénicos con marcadores fluorescentes en el cromosoma Y	8
1.5 Establecimiento de metilación en alelos, epialelos y transgénicos	10
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 Animales utilizados	13
3.2 Obtención de embriones de ampulla	14
3.3 Obtención de fetos.....	15
3.4 Detección de la emisión de fluorescencia	16
3.4.1 Detección de fluorescencia en blastocistos y fetos	16
3.4.2 Detección de fluorescencia en ratones y tejidos YeGFP.....	17
3.5 Congelación de embriones	17
3.6 Identificación del sexo	17
3.6.1 Observación de genitales en ratones recién nacidos y adultos.....	18
3.6.2 PCR para el sexado de embriones y fetos de desarrollo temprano	18
3.6.3 Identificación del anillo germinal	19
3.7 Metilación de líneas de fibroblastos embrionarios (mEF) de ratones YeGFP... ..	20
3.7.1 Cultivo de MEFs, extracción de ADN y tratamiento con bisulfito.....	20
3.7.2 Clonación	22

•	Ligación del inserto en el vector	22
•	Transformación	22
•	PCR colonia	22
3.7.3	Purificación y secuenciación	23
3.8	Fecundación <i>in vivo</i>	24
3.9	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	24
3.9.1	Obtención de espermatozoides de ratón para FIV	25
3.9.2	Cálculo de la concentración espermática	25
3.9.3	Obtención de ovocitos y FIV	25
3.10	Estudio de la motilidad espermática mediante CASA (<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>)	26
3.11	Análisis estadístico	28
4.	RESULTADOS	30
4.1	Análisis de la expresión del transgén	30
4.1.1	Variaciones del fenotipo en la descendencia	30
4.1.2	Análisis de la emisión de fluorescencia durante el desarrollo fetal	32
4.2	Análisis metilación	33
4.3	Análisis de la emisión de fluorescencia en tejidos del transgénico YeGFP adulto	35
4.4	Análisis de la transmisión del transgén por fecundación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ..	38
4.4.1	Análisis de la motilidad espermática	39
5.	DISCUSIÓN	42
6.	CONCLUSIONES	46
7.	AGRADECIMIENTOS	47
8.	BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Contenido génico y estructura del cromosoma Y de ratón. El brazo corto ha conservado genes no amplicónicos ancestrales. El brazo largo contiene repeticiones palindrómicas y en tándem alternas de bloques centrales amplicónicos en todas partes. Los bloques centrales amplicónicos abarcan grupos de genes específicos de roedores... 4
- Figura 2.** Estrategia para la generación de ratones YeGFP donde se integra la construcción CAG-eGFP en la región intergénica de los genes *Ddx3y* y *Uty*, ambos ubicados en el brazo corto del cromosoma Y. Los embriones inyectados se transfieren a hembras pseudogestantes..... 10
- Figura 3.** Esquema del procedimiento para estudiar la transmisión *in vivo* del transgén YeGFP (A) y para analizar la expresión durante el desarrollo embrionario en tres fases del desarrollo embrionario; blastocisto (B), fetos de día 8,5-10,5 (gastrulación) (C) y en fetos de día 11,5-17,5 (organogénesis) (D). 14
- Figura 4.** Esquema del desarrollo embrionario en ratón y de la localización en oviducto o en útero de cada estadio de desarrollo (A). Fotografías de los estadios analizados: (B) blastocistos, (C) fetos en gastrulación, y (D) fetos E13 en etapa de organogénesis. 16
- Figura 5.** Emisión de fluorescencia de la descendencia de cruces de machos YeGFP con hembras WT por monta natural iluminados con linterna de luz LED azul. Se observa un macho VMI a la izquierda y los dos machos de la derecha son VPI..... 17
- Figura 6.** Distancia ano-genital en ratones, hembra (A) y macho (B) adultos. 18
- Figura 7.** Anillos germinales de fetos de 12,5 días. A la izquierda el anillo germinal corresponde a una hembra y a la derecha el de un macho..... 20
- Figura 8:** Esquema representando el transgén introducido entre los dos genes del chr-Y y señalando en negro la región rica en CpGs donde se analiza la metilación. 20
- Figura 9.** Parámetros cinéticos determinados por los equipos CASA en el análisis de motilidad espermática..... 27
- Figura 10.** Diagrama de pedigrí de padres YeGFP de fluorescencia conocida.....31

Figura 11. Imágenes de los blastocistos YeGFP. En las fotografías a (campo claro) y b (fluorescencia) se muestran los blastocistos machos y hembras producidos con esperma de machos VPI o VMI. En c (campo claro) y d (fluorescencia) se muestran blastocistos machos producidos por esperma de machos NoV. En d se muestra con un asterisco el embrión con alta expresión del transgén comparado con el resto de poca expresión. ...	31
Figura 12. Análisis de la expresión del transgén durante el desarrollo fetal. A. Descendencia de padres no verdes. B. Descendencia de padres verdes poco intenso. C. Descendencia de padres verdes muy intenso.....	32
Figura 13. Análisis de la metilación del transgén en los diferentes grupos de animales Tgs: NoV, VPI y VMI. (B) <i>Heatmap</i> del porcentaje de metilación de cada CpG en los tres grupos de animales transgénicos (verde muy intenso, poco intenso y no verde). ...	34
Figura 14. <i>Heatmap</i> del porcentaje de metilación de cada CpG en los tres grupos de animales transgénicos (verde muy intenso, poco intenso y no verde).	35
Figura 15. Imágenes en campo claro y fluorescencia mostrando la expresión de eGFP en distintos órganos de los ratones machos WT y transgénicos. En cada imagen se sitúa a la izquierda la muestra de un ratón transgénico XeGFP, en medio un WT y a la derecha la de un ratón YeGFP.	36
Figura 16. Emisión de fluorescencia homogénea o en mosaico de tres crías de ratón; de izquierda a derecha: un macho y una hembra heterocigotos de la línea XeGFP, y un macho de la línea YeGFP.....	37
Figura 17. Resultados del porcentaje de hembras en la descendencia procedente de cruces de machos YeGFP con hembras WT <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sexados mediante PCR de blastocistos.	38
Figura 18. Variables cinemáticas de los espermatozoides YeGFP agrupados en <i>clusters</i>	41
Figura 19. Porcentajes de espermatozoides YeGFP pertenecientes a cada <i>cluster</i>	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Primers</i> utilizados para las PCRs.	24
Tabla 2. Variables cinemáticas de espermatozoides de machos YeGFP y control (n=5 machos por grupo).....	39
Tabla 3. Resultados del análisis de componentes principales para los parámetros cinemáticos analizados en los espermatozoides de YeGFP.	40
Tabla 4. Resultados del análisis multivariado de conglomerados de k-medias para clasificar los espermatozoides en un número reducido de subpoblaciones (<i>clusters</i>) según sus variables cinemáticas.....	40

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (*Amplitude of Lateral Head displacement*)

BCF: frecuencia de batido (*Beat-Cross Frequency*)

Chr: cromosoma

Chrs: cromosomas

CASA: *Computer Assisted Sperm Analysis*

COCS: complejo cúmulo-ovocito (*Cumulus Oocyte Complexes*)

CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-Associated 9*

dNTP: Deoxinucleósido trifosfato (*Deoxynucleotide Triphosphate*)

eGFP: proteína verde fluorescente potenciada (*enhanced Green Fluorescent Protein*)

ES: células madre embrionarias (*Embryonic Stem cells*)

FCS: suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*)

FIV: Fecundación *In Vitro*

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

hCG: gonadotropina coriónica humana (*human Chorionic Gonadotropine*)

HTF: *Human Tubular Fluid*

IAP: partícula A intracisternal (*Intracisternal A Particle*)

Kin: *knock in*

KO: *knock out*

KSOM: medio de cultivo de embriones (*Mouse Embryo Culture Medium*)

LIN: índice de linealidad (*Linearity of forward progression*)

mEF: fibroblasto embrionario de ratón (*mouse Embryonic Fibroblast*)

MSY: región específica de machos del cromosoma Y (*Male-Specific region of the Y chromosome*)

NoV: ratones No Verdes

OMG: Organismo Modificado Genéticamente

PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PMSG: gonadotropina coriónica equina (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)

RFP: proteína fluorescente roja (*Red Fluorescent Protein*)

sgRNA: ARN guía (*small guide RNA*)

SOC: medio de cultivo bacteriano

STR: índice de rectitud (*Straightness*)

Spz: espermatozoides

TALEN: *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

Tg: transgénico

Tgs: transgénicos

ISAS: *Integrated Semen Analysis System*

VAP: velocidad media (*Average Path Velocity*)

VCL: velocidad curvilínea (*Curvilinear Velocity*)

VMI: ratones Verdes Muy Intensos

VPI: ratones Verdes Poco Intensos

VSL: velocidad rectilínea (*Straight-Line Velocity*)

WOB: índice de oscilación (*path Wobble*)

WT: *Wild Type*

XCI: Inactivación del cromosoma X (*X-Chromosome Inactivation*)

XeGFP: modelo de ratón de transgénico que presenta eGFP en el cromosoma X

YeGFP: modelo de ratón de transgénico que presenta eGFP en el cromosoma Y

ZFN: nucleasas con dedos de zinc (*Zinc-Finger Nuclease*)

RESUMEN

Actualmente, son pocos los modelos transgénicos (Tgs) en el cromosoma (chr) Y que se han conseguido diseñar debido a la complejidad que supone introducir un transgén en este chr. El desarrollo del sistema CRISPR-Cas9 ha permitido generar un modelo de ratón denominado YeGFP donde se ha introducido un transgén eGFP entre los genes *Uty* y *Ddx3y* del chr-Y. En este trabajo se ha estudiado si el transgén presente en dicho chr se expresa y se transmite de forma similar a los Tgs integrados en otro chr. Para ello, se ha analizado cómo el transgén se expresa durante el desarrollo fetal y en los principales tejidos del adulto, así como su transmisión tanto por fecundación *in vivo* como *in vitro* (FIV). Dicho análisis permite clasificar a los ratones en animales con expresión alta, media y baja, estando la metilación de una región CpG del transgén inversamente correlacionada con la expresión. Sorprendentemente, la fluorescencia de estos machos en la piel es tipo mosaico, similar a la observada en las hembras que portan una copia en hemicigosis de un transgén eGFP ligado al X (debido a la inactivación de un chr-X), y muestran herencia clonal del estado activo o inactivo a través de la división celular. Además, los animales muestran una expresión diferencial según el tejido. Por otro lado, al cruzar machos YeGFP con hembras *wild type* (WT), se produce una transmisión estable de eGFP en la línea germinal masculina sin afectar la proporción de sexos pero inesperadamente, cuando se realiza FIV, el 94 % de los embriones son hembras. Usando el análisis CASA de la cinética de motilidad y el análisis de conglomerados de k-medias, se encontraron diferentes subpoblaciones de espermatozoides (spz) entre YeGFP y WT. Esto sugiere que la motilidad diferencial o la cinética de capacitación podrían ser la razón de la alteración de la proporción de sexos producida por la FIV, y que *in vivo*, esa diferencia se ve enmascarada debido a que los spz, con o sin eGFP, nadan en grupos dinámicos.

Palabras clave: cromosoma Y, transgénico, CRISPR-Cas9, GFP, epigenética, mosaicismo, proporción de sexos.

ABSTRACT

Nowadays, not many Y chromosome (chr) transgenic models have been designed due to the difficulty of introducing a transgene into the Y chr. CRISPR-Cas9 technology development has allowed to produce a transgenic mouse called YeGFP where an eGFP transgene has been introduced between the *Uty* and *Ddx3y* genes of the Y chr. In this work it has been analyzed if the transgene present on that chr is expressed and transmitted similarly as one integrated into another chr. For that purpose, it has been analysed how the transgene is expressed during foetal development and in the main tissues of the adult, and its transmission by both *in vivo* and *in vitro* fertilization (IVF). Fluorescence expression analysis allows to classify mice into high, medium, and low expression animals, and methylation analysis of a CpG region of the transgene shows an inverse correlation with this expression. Surprisingly, these males have mosaic green fluorescence in the skin, similar to females carrying one copy (hemizygous) of an X-linked eGFP transgene owing to inactivation of one chr-X and show clonal inheritance of the inactive state through cell division. In addition, a differential expression depends on the observed tissue. On the other hand, after mating YeGFP males with WT females it is found stable male germline transmission of eGFP without affecting the sex ratio of the line but unexpectedly, when it is performed IVF 94% of the embryos are female. Using CASA analysis of motility kinetics and k-means cluster analysis, different sperm subpopulations were found between YeGFP and WT. This suggests that differential motility or capacitation kinetics could be the reason for the sex ratio alteration produced by IVF. This differences are hidden *in vivo* because sperm, with or without eGFP, swims in dynamic groups.

Palabras clave: Y chromosome, transgenic, CRISPR-Cas9, GFP, epigenetics, mosaicism, sex ratio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cromosoma Y del ratón

El chr-Y del ratón, por la posición de su centrómero, se clasifica como acrocéntrico, es decir, su constricción primaria está situada hacia el extremo, dividiéndolo en dos brazos muy desiguales, uno bastante largo y el otro muy corto. La mayoría de los genes están contenidos en el brazo corto, y el brazo largo se compone predominantemente de repeticiones amplicónicas (unidades de ADN o genes repetidas) (**Fig. 1**). De hecho, el 98% del ADN eucromático del chr-Y de ratón (89,5 Mb, 99,9 % del chr completo) es una secuencia amplicónica densa en genes, que se parece más a la composición de los autosomas del ratón que a los chrs Y de otras especies, ya que, por ejemplo, el chr-Y humano, se compone aproximadamente de solo un 40% de eucromatina (22,8 Mb del total de 57 Mb) (Soh *et al.*, 2014). La región específica de macho del chr-Y (MSY) de ratón presenta un gran número de genes adquiridos *de novo*, masivamente amplificados y específicos del linaje de roedores, estando presentes en las diferentes variedades de *Mus musculus*. Las secuencias ancestrales (2 Mb) se encuentran en la región MSY del brazo corto. De estas 2 Mb, 1,6 Mb corresponden a 13 genes de copia única y un gen duplicado, y 0,4 Mb es secuencia amplicónica que contiene la familia génica Rbmy (*RNA binding motif protein, Y chromosome*) (**Fig. 1**) (Zhang *et al.*, 2010).

En la mayor parte de los mamíferos, con algunas excepciones, que un embrión sea un macho o una hembra se define por la presencia o ausencia de un chr-Y (Capel, 2017). El chr-Y de los mamíferos, además de la determinación del sexo, es fundamental para la espermatogénesis. Sin embargo, vincular cada gen de este chr con aspectos específicos de la reproducción masculina ha sido un desafío, ya que este es notoriamente difícil de secuenciar y orientar, y los estudios funcionales se han basado principalmente sobre enfoques de rescate de transgenes utilizando modelos de ratón con grandes deleciones multigénicas. Estas limitaciones experimentales han dirigido el campo hacia la búsqueda de un conjunto mínimo de genes del chr-Y necesarios para la reproducción masculina.

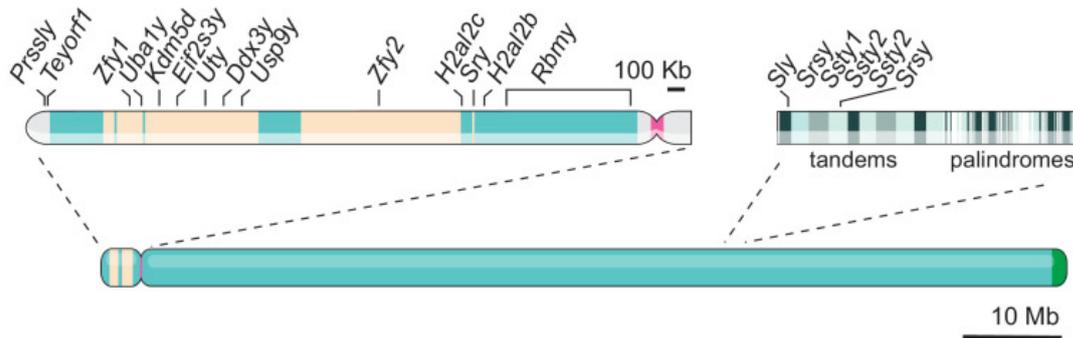


Figura 1. Contenido genético y estructura del chr-Y de ratón. El brazo corto ha conservado genes no amplicónicos ancestrales. El brazo largo contiene repeticiones palindrómicas y en tándem alternas de bloques centrales amplicónicos en todas partes. Los bloques centrales amplicónicos abarcan grupos de genes específicos de roedores.

Se ha propuesto que el contenido genético del chr-Y se especializó a través de selección para mantener la dosis ancestral de pares de genes X-Y homólogos que funcionan como reguladores ampliamente expresados de la transcripción, traducción y estabilidad de proteínas. Por lo tanto, más allá de sus funciones en la determinación de los testículos y la espermatogénesis, el chr-Y es esencial para la viabilidad masculina (Bellott *et al.*, 2014). Entre las funciones de los genes conservados en el chr-X y el Y se encuentran genes relacionados con ubiquitinación, transcripción, modificación de la cromatina, splicing, traducción, etc. (Bellott *et al.*, 2014). Entre estos genes se encuentran *Ddx3y* (*Helicase 3 Y-Linked*) relacionado con splicing y traducción y a *Uty* (*Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y chromosome*) relacionado con ubiquitinación y modificación de la cromatina, de los que posteriormente se hablará en este trabajo.

1.2 Expresión de cromosomas sexuales

En mamíferos, debido a las diferencias de los chrs sexuales entre machos (XY) y hembras (XX), existe una regulación de la dotación genética (Loda y Heard, 2019). Las hembras de mamíferos sufren el proceso conocido como Inactivación del Chr-X (XCI), un proceso epigenético que silencia la transcripción de uno de los chrs-X para compensar esta diferencia de material genético (Sierra y Anguera, 2019).

El mecanismo de XCI se inicia en el embrión dando lugar a un chr-X inactivo (Xi) y consiste en un proceso de silenciamiento transcripcional y heterocromatinización de un chr-X mediante un ARN largo no codificante llamado Xist, codificado por el centro de inactivación-X (Sahakyan *et al.*, 2018). El gen Xist se transcribe a un ARN funcional y

se propaga en cis (Jonkers *et al.*, 2008) afectando solo al chr-X del que se transcribe, que es el que se va a inactivar (Brockdorff, 2019). El mecanismo XCI se lleva a cabo en todas las células de la línea somática (Jonkers *et al.*, 2008) y la inactivación de uno u otro chr-X de la hembra se produce al azar (Penny *et al.*, 1996).

1.3 Producción de transgénicos en el chr-Y

La determinación del sexo en mamíferos viene dada por un sistema de chrs sexuales XX/XY (♀/♂) con origen autosómico que han divergido evolutivamente en estructura y secuencia debido a las inversiones producidas en el chr-Y, lo que provocó el bloqueo de la recombinación entre los chrs X e Y en la meiosis (excepto en las regiones pseudo-autosómicas). Esto desencadenó el cambio y la evolución de regiones dentro del chr-Y donde se produjeron deleciones, pérdida de genes y acumulación de secuencias no codificantes (repeticiones en tándem), transposones y pseudogenes, que han dotado al chr-Y de una estructura característica y que ha ocasionado grandes dificultades para poder obtener su secuencia (Soh *et al.*, 2014).

Aunque el proyecto del genoma humano se completó en 2004 (*Consortium*, 2004), la secuencia completa del chr-Y no ha sido descifrada todavía debido al alto grado de secuencias repetidas y a la presencia de grandes regiones de heterocromatina (Yano *et al.*, 2020). Los ratones se utilizan a menudo como organismo modelo, y en 2002 se publicó un borrador de la secuencia de su genoma sin suficientes datos del chr-Y (*Mouse Genome Sequencing Consortium*, 2002). Después de esto, Sho *et al.* (2014) lo volvieron a secuenciar gracias a la técnica SHIMS (*single-haplotype iterative mapping and sequencing*) y Yano *et al.* (2020) utilizaron la tecnología FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) y con secuenciación de lectura larga (*Oxford Nanopore Technologies*) para secuenciar con éxito algunas regiones de este chr, sin embargo, la secuencia genómica completa del chr-Y de ratón sigue sin estar clara debido a la región amplicónica caracterizada por secuencias repetidas, que cubre el 98 % del chr.

Esta falta de secuencias de referencia de alta calidad y de información sobre el chr-Y supone un desafío para poder analizar la función de genes individuales de este chr. Aun así, el avance de la biotecnología animal de los últimos años ha favorecido el desarrollo de nuevas técnicas que permiten introducir, eliminar o modificar de forma específica un gen o una secuencia de ADN en el genoma de un organismo para producir animales con nuevas características genéticas, de esta forma se obtienen los llamados organismos modificados genéticamente (OMG) y Tgs (Marco y Vicente, 2012).

Para averiguar la función de un gen se generan modelos *knock out* (KO) en los que se busca bloquear la expresión de un gen determinado (eliminando un fragmento del mismo o introduciendo una mutación en su secuencia que impida su traducción), y modelos *knock in* (Kin) en los que se introduce una mutación en un gen o se sustituye un gen por otro para reproducir alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o inserciones que son relevantes para el estudio de la función génica (Marco y Vicente, 2012).

Debido a la presencia de secuencias repetidas en el chr-Y es difícil utilizar el método convencional de recombinación homóloga o *gene targeting* (Yano *et al.*, 2020) para introducir secuencias y generar modelos Kin, aunque en algunos trabajos se ha conseguido, como es el caso de Tojo *et al.* (1988), que lograron introducir con esta técnica el gen de gamma- y beta-globina humana A en el chr-Y de ratones exitosamente. De manera alternativa a estas técnicas, las tecnologías recientes de edición génica, como las nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés *zinc-finger nuclease*) y CPISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated 9*) son herramientas muy eficientes y han permitido modificar muchas secuencias en autosomas de ratón, sin embargo tienen algunas limitaciones al editar en el chr-Y (Yano *et al.*, 2020).

Existen algunos trabajos en los que se han conseguido generar ratones KO en el chr-Y con estas tecnologías de edición génica, como por ejemplo, mediante TALEN, se ha conseguido producir un KO del gen *Sry* para observar su papel en la diferenciación sexual (Kato *et al.*, 2013) o del gen *Eif2s3y* que tiene un papel clave en la diferenciación de las espermatogonias en ratón y su ausencia provoca la detención de la espermatogénesis (Matsubara *et al.*, 2015). Mediante CRISPR-Cas9 también se han producido modelos KO como en el estudio de Nakasuji *et al.* (2017), donde consiguieron generar un modelo KO *Zfy1* y *Zfy2* y determinaron el papel de estos genes del chr-Y en la espermatogénesis. También mediante esta técnica, Zuo *et al.* (2017) eliminaron una gran cantidad de genes en el chr-Y de ratón Y (*Zfy1*, *Ube1y1*, *Kdm5d*, *Ddx3y*, *Usp9y*, *Erdr1*, *Sry*, *Eif2s3y*) y determinaron mediante el análisis fenotípico de los animales cuales eran las funciones de esos genes.

Sin embargo, son pocos los trabajos que han conseguido diseñar con éxito un ratón Kin en el chr-Y debido a la dificultad que conlleva. Por ejemplo, Imaimatsu *et al.*, (2018)

establecieron una línea Kin mediada por CRISPR-Cas9 de secuencias *Flag-tag* en el locus *Sry* del chr-Y y en el trabajo de Hirata *et al.*, (2022) se generó un modelo de ratón con el transgén de la proteína fluorescente roja (RFP) expresado en el chr-Y pero mostró fenotipo letal después del nacimiento, por eso, diseñaron otro modelo de ratón Tg RFP ligado al chr-Y con tdTomato localizado en las mitocondrias para reducir la citotoxicidad. Otro ejemplo de ratón Kin en el chr-Y diseñado con CRISPR-Cas9 es el modelo de ratón en el que se basa este trabajo y que se realizó en base al estudio de Zhao *et al.*, (2019), en el que introdujo el transgén eGFP o GFP *enhanced* (una versión de GFP con modificaciones puntuales para aumentar la intensidad de fluorescencia) con el objetivo de identificar el sexo de embriones de ratón en estado pre-implantacional.

El sistema CRISPR-Cas9 es una tecnología de edición de genes que consta de dos componentes esenciales, una molécula de ARN guía y una enzima endonucleasa que provoca una ruptura del ADN de doble cadena, lo que permite modificaciones en el genoma. El sistema CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genética se describió por primera vez en 2013, aunque años antes los microbiólogos ya habían informado de la presencia de secuencias repetidas en el genoma de bacterias y arqueas, que funcionaban como un sistema inmunitario adaptativo utilizado por algunos microorganismos como estrategia de defensa frente a virus (bacteriófagos) (Mojica *et al.*, 1993). Estas tijeras moleculares de alta precisión atacan el genoma del virus invasor en las bacterias inmunes a ese patógeno, y, a su vez, en células animales, pueden realizar una función similar, cortando el gen que nosotros le indiquemos, según la guía utilizada. Resumidamente, el funcionamiento de este sistema consiste en que el ARN guía (sgRNA) conduce a la nucleasa Cas9 a una región diana complementaria del genoma, y para cortar el ADN es necesaria la presencia de una secuencia específica de entre 2 y 5 nucleótidos llamada PAM (motivo adyacente protoespaciador) en el extremo 3'. La reparación del corte del ADN puede ocurrir a través de dos vías: por la unión de extremos no homólogos, que es propensa a cometer errores y produce inserciones y deleciones (indels) que provocarán la inactivación del gen, o por reparación dirigida por homología, en la que se utiliza una secuencia de ADN como plantilla de reparación, es decir, busca la presencia de una secuencia de ADN homóloga y al encontrarla provoca una recombinación homóloga. Es este último el que permite la edición precisa del genoma ya que la sección homóloga de ADN con el cambio de secuencia requerido puede entregarse con la nucleasa Cas9 y el

sgRNA, lo que teóricamente permite cambios tan precisos como un solo par de bases (Gupta *et al.*, 2019).

1.4 Modelos transgénicos con marcadores fluorescentes en el chr-Y

La proteína fluorescente verde (GFP) es producida por *Aequorea victoria*, una medusa que emite bioluminiscencia para atraer a sus presas, y es muy utilizada en ciencia como marcador, por ejemplo, para identificar el genotipo de animales Tgs, rastrear un linaje celular específico o estudiar la localización o momento de expresión de ciertos genes ya que confiere una fluorescencia verde característica a los organismos Tgs resultantes.

Hasta la fecha, se han publicado 3 artículos donde se han insertado genes de proteínas fluorescentes en el chr-Y del ratón (Yamamoto *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2019; Hirata *et al.*, 2022) resultando en un modelo de selección de embriones de un sexo determinado antes de la implantación. A pesar de que las tres líneas son funcionales, existen diferencias en relación a la expresión del marcador.

La línea de ratón Y-GFP creada por Yamamoto *et al.* (2014) se generó mediante la inserción del gen de GFP en el chr-Y de ratón, en una repetición específica del brazo largo. Para la generación del transgén se transformaron con la construcción células madre embrionarias (ES) que luego se usaron para generar ratones Tgs. Se evaluó la fluorescencia de GFP en la progenie masculina portadora del chr-Y modificado en estadio de blastocisto y a mitad de la gestación (d10.5). Si bien todos los embriones masculinos eran fluorescentes, no presentaban un patrón uniforme, sino que tenían regiones de mayor fluorescencia que el resto del embrión.

En un segundo trabajo, comentado en el apartado anterior, los ratones YeGFP fueron producidos por Zhao *et al.* (2019) mediante CRISPR-Cas9 para insertar el transgén eGFP entre los genes *Ddx3y* y *Uty* del chr-Y del ratón mediante microinyección pronuclear de cigotos. Los machos YeGFP fundadores Tgs se detectaron por la presencia de fluorescencia en la piel del ratón macho adulto, y estos machos se aparearon para producir la cepa Tg. La expresión de eGFP se evaluó en la etapa de blastocisto y se encontró que eran fluorescentes en la totalidad del embrión, a diferencia del modelo anterior. Sin embargo, en el ratón YeGFP no se evaluó la expresión del transgén en la mitad de la gestación, ni tampoco en la etapa adulta se analizó cómo y en que tejidos se expresaba.

El tercer modelo publicado en 2022 (Hirata *et al.*, 2022), mencionado previamente, utilizó la transformación de células madre troncales para producir el Tg introduciendo una proteína fluorescente roja (RFP) en el chr-Y, transgén al que unieron una señal de localización mitocondrial para evitar letalidad. Observaron que la expresión era homogénea en todos los blastocistos macho tanto en recién nacidos como en adultos, pero no se analizó la expresión durante el desarrollo fetal o en los tejidos del animal adulto.

En este trabajo se pretende analizar en detalle cómo se trasmite y como se expresa un marcador GFP en el chr-Y, y compararlo con la expresión y transmisión de secuencias integradas en otro chr. Para ello, se ha utilizado un modelo de ratón Tg YeGFP producido previamente en el INIA mediante la técnica CRISPR-Cas9 en el que se introdujo el transgén eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*). Para la obtención del Tg, se utilizó como referencia el artículo de Zhao *et al.* (2019) y se seleccionó un locus específico para la integración de eGFP en la región intergénica de los genes *Ddx3y* y *Uty* del brazo corto del chr-Y. Mediante un software en línea (<https://zlab.bio/guide-design-resources>) se pudieron predecir los posibles sitios diana del sgRNA y se seleccionó aquel con mejor homología. En esa región fue donde se insertó el plásmido donante que contenía eGFP con un promotor híbrido y ubicuo (CAG), formado por el *enhancer* de citomegalovirus y el promotor de la β -actina de pollo, que produce alta expresión del transgén. La microinyección se llevó a cabo en el laboratorio de transgénesis del Departamento de Reproducción Animal del INIA y se introdujo conjuntamente Cas9, sgRNA y un plásmido donante en el citoplasma de cigotos obtenidos de hembras superovuladas, y Cas9 fue guiado por el sgRNA para dar como resultado la incorporación del plásmido donante a través de una reparación dirigida por homología. Los embriones microinyectados se cultivaron hasta estadio de blastocisto y se transfirieron al útero de ratonas receptoras pseudo-gestantes, que tras 21 días dieron lugar a la descendencia, de los cuales los machos eran ratones quiméricos YeGFP (**Fig. 2**).

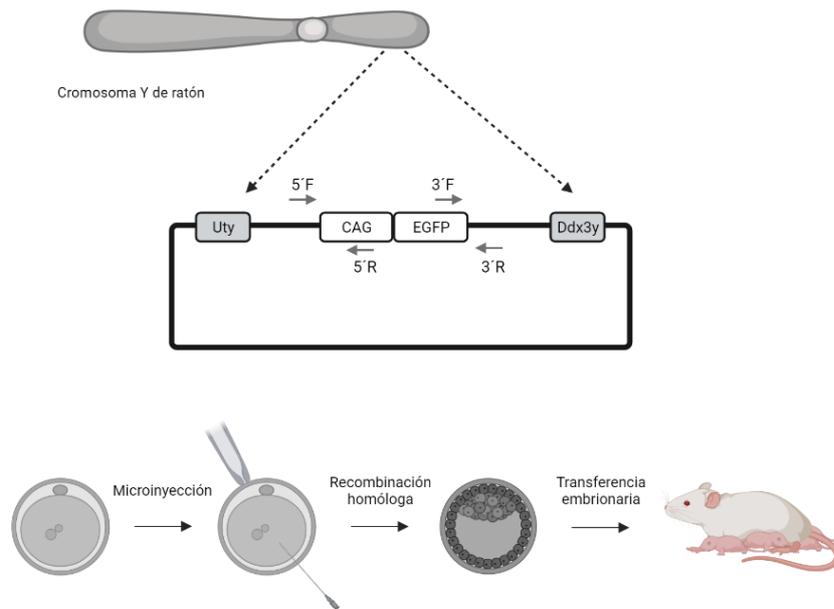


Figura 2. Estrategia para la generación de ratones YeGFP donde se integra la construcción CAG-eGFP en la región intergénica de los genes *Ddx3y* y *Uty*, ambos ubicados en el brazo corto del chr-Y. Los embriones inyectados se transfieren a hembras pseudogestantes.

Tras esto, se produjeron las líneas YeGFP transgénicas cruzando los ejemplares positivos con hembras de tipo salvaje (WT). Para verificar la precisión del sitio de integración de eGFP en la generación F1 de ratones YeGFP, se realizó un análisis de genotipado por PCR y secuenciación.

Tal y como se desarrollará a continuación, este modelo de ratón Tg ha sido el objeto de estudio de este trabajo, para analizar su expresión y determinar cómo se trasmite el transgén a la descendencia.

1.5 Establecimiento de metilación en alelos, epialelos y transgénicos

Las modificaciones epigenéticas en los genomas de spz y ovocitos se borran en gran medida poco después de la fecundación, se restablecen durante el desarrollo preimplantacional y posteriormente de forma específica, en cada linaje celular y tejido (Jaenisch y Bird, 2003; Reik *et al.*, 2001). Se desconoce con exactitud cómo se produce este establecimiento del programa epigenético y cuáles son los momentos críticos (durante el desarrollo embrionario y/o fetal) donde se determina el patrón de metilación y el programa epigenético de los distintos componentes del genoma. En la mayoría de los loci genómicos, la metilación de las regiones CpG está muy regulada, lo que resulta en poca variación interindividual en el epigenotipo (Fraga *et al.*, 2005; Rakyan *et al.*, 2004). Sin embargo, en mamíferos, algunos alelos muestran una expresividad variable a pesar

de la ausencia de heterogeneidad genética. Esto se debe a que el estado epigenético influye en la actividad de estos alelos. Cuando el estado epigenético es lábil, da como resultado mosaicismo fenotípico entre células (variegación) y entre individuos (expresividad variable) (Rakyan *et al.*, 2002). Estos loci con estados de metilación variable entre individuos sin diferencias genéticas pero con expresión constante en los tejidos de un mismo individuo se denominan epialelos metaestables (Bourc'his, 2021).

En el genoma del ratón, tal estocasticidad epigenética es rara y se ha observado principalmente en retrovirus endógenos de la familia de partículas A intracisternales (IAP). Un ejemplo bien conocido es el alelo amarillo viable Agouti (A^{vy}), una inserción espontánea de IAP, cerca del gen Agouti, cuyo estado de metilación del ADN influye en la expresión del gen de la capa de color Agouti. Analizando epialelos en ratón producidos por la inserción de un elemento IAP se ha sugerido que el establecimiento individual de la metilación del epialelo *Axin^{Fu}* se produce en dos periodos; justo antes de la gastrulación y durante la fase de organogénesis fetal en la que puede variar ligeramente la metilación de la cola del individuo (Waterland *et al.*, 2006).

Generalmente, las secuencias transgénicas son estables en la descendencia y dan lugar a un fenotipo constante; sin embargo, en algunos casos, la expresión del transgén puede variar entre individuos en la descendencia, incluso puede silenciarse la expresión en alguno de los descendientes (Zhou *et al.*, 2014). La metilación del ADN puede ser uno de los factores que produce esta variación en la expresión del transgén, y puede incluso causar cambios en la estructura cromosómica, la conformación y la estabilidad del ADN, así como la interacción entre el ADN y la proteína, regulando así la expresión génica. Si el transgén contiene islas CpGs, o se integra en regiones cromosómicas altamente metiladas, podría afectar a la transcripción y expresión del mismo (Whitelaw *et al.*, 2001).

En los pocos modelos transgénicos en los que se ha insertado un marcador en el chr-Y, no se ha realizado un estudio en detalle de la posible variación de la expresión del transgén entre individuos y de su transmisión a la descendencia. Por eso, con el fin de abordar estas cuestiones, se planteó este trabajo.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS

El **objetivo principal** de este trabajo es determinar en un ratón Tg YeGFP producido mediante tecnología CRISPR-Cas9, cómo el transgén se trasmite *in vivo* e *in vitro* y cómo se expresa durante el desarrollo fetal, al nacimiento, y en los principales tejidos del adulto.

En primer lugar, para observar si la expresión del transgén es homogénea y constante se ha seguido la emisión de fluorescencia de los embriones desde el estadio de blastocisto hasta fetos de día 17,5 (**Fig. 3b, c y d**). Para observar en que tejidos se expresa el transgén se ha observado la fluorescencia de diferentes órganos de machos YeGFP adultos.

En segundo lugar, debido a la diferente intensidad de expresión observada en los Tg, se ha analizado si estas diferencias se deben a la metilación de la principal isla CpG presente en el transgén.

En tercer lugar, se ha analizado la transmisión del transgén, tanto por fecundación *in vivo* como *in vitro*.

En cuarto lugar, se han analizado los posibles eventos que pueden estar implicados en la inesperada transmisión *in vitro* del transgén mediante el análisis de la motilidad y la estructura de las subpoblaciones de los spz YeGFP.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales utilizados

Los procedimientos experimentales con ratones se realizaron bajo el cumplimiento de la normativa reflejada en el Real Decreto 53/2013, transposición nacional de la Directiva 2010/63/UE, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación. Así, la manipulación se llevó a cabo evitando todo lo posible el sufrimiento animal. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de ética de experimentación animal del INIA-CSIC (número de permiso CEEA 2014/025. PROEX 137.2/21). Todos los procedimientos de eutanasia y manejo fueron realizados por personal autorizado.

Los ratones Tg YeGFP tienen como base genética el cruce B6CBA (C57BL6 x CBA) (*Mus musculus*). Además de los Tg se han utilizado ratonas B6CBAF1 para analizar la transmisión y expresión del transgén. Los animales se mantuvieron en el animalario del Departamento de Reproducción Animal del INIA-CSIC bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y 40-60% de humedad. El animalario mantiene un fotoperiodo constante (14 h de luz y 10 h de oscuridad) y los ratones tienen acceso a agua y comida *ad libitum*. Como control en la comparación al modelo de estudio, se ha usado una cepa de ratones transgénicos, que lleva el marcador eGFP en el chr-X (tg CAG-EGFP-CX-FM038Osb) (Okabe *et al.*, 1997). Se sabe que la cepa XeGFP lleva el transgén en el locus D y se ha descrito que se expresa en todos los tejidos excepto en eritrocitos y pelo (Nakanishi *et al.*, 2002). Además, tiene expresión constante durante el desarrollo embrionario y fetal, y en los tejidos de los animales adultos. En la cepa YeGFP se sabe que el transgén está introducido entre los genes *Uty* and *Ddx3y* del brazo corto del chr-Y, pero se desconocen los tejidos donde se expresa y cómo se regula dicho transgén en la descendencia. Ambos Tgs contienen la misma construcción, el promotor híbrido y ubicuo (CAG), formado por el *enhancer* de citomegalovirus (CMV) y el promotor de la β -actina de pollo y el gen *enhanced* de la proteína fluorescente verde (eGFP) (Cormack *et al.*, 1996), que es una versión de GFP (Prasher *et al.*, 1992) con mutaciones que permiten la expresión en células de mamífero y aumenta la expresión la versión previa.

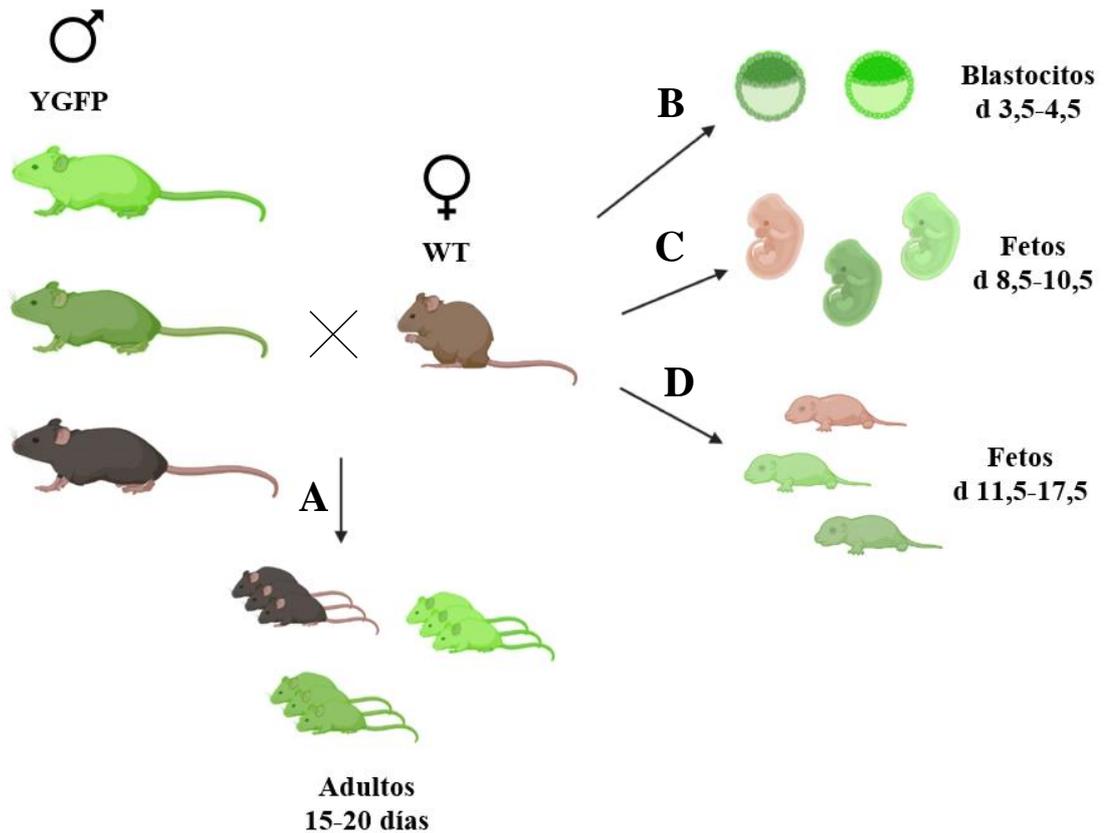


Figura 3. Esquema del procedimiento para estudiar la transmisión in vivo del transgén YeGFP (A) y para analizar la expresión durante el desarrollo embrionario en tres fases del desarrollo embrionario; blastocisto (B), fetos de día 8,5-10,5 (gastrulación) (C) y en fetos de día 11,5-17,5 (organogénesis) (D).

3.2 Obtención de embriones de ampulla

Para la obtención de embriones se utilizaba la superovulación previa de las hembras, ya que de esta manera se producen de 3 a 5 veces más óvulos por hembra de los que se obtienen de forma natural, minimizando el número de animales utilizados por experimento.

El método consistió en la inyección intraperitoneal de dos hormonas gonadotropinas disueltas en suero fisiológico que aumentan el número de folículos estimulados y, por tanto, el número de óvulos susceptibles de ser fecundados. Entre la una y las tres de la tarde se administró por hembra 7,5 U.I. de PMSG (Folligon 500, Intervet) que tiene acción folículo estimulante y a las 48 horas 5 U.I. hCG (Veterin Corion), que tiene acción luteinizante. Una vez administrada la segunda hormona, se cruzaron las hembras con un macho YeGFP previamente individualizado. El proceso se

realizó en el animalario del departamento de Reproducción Animal del INIA siguiendo los protocolos de higiene y seguridad. La cópula se comprobó a la mañana siguiente mediante la visualización del tapón vaginal, formado por proteínas coaguladas provenientes de los fluidos seminales del macho.

Las hembras con tapón vaginal se sacrificaron mediante dislocación cervical entre las 11-12 de la mañana. A continuación, con ayuda de tijeras y pinzas, se extrajo el oviducto, sección comprendida entre el cuerno uterino y el ovario, y se depositó en medio M2 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Trabajando bajo la lupa (Nikon SMZ645, Tokio, Japón), se depositó el oviducto sobre una placa con varias microgotas de aproximadamente 25 μ L de hialuronidasa 350 UI/mL (Sigma-Aldrich). Sobre la primera microgota se desgarró el *ámpula* y se liberaron los embriones de día 0,5 de gestación, donde se apreciaban los pronúcleos. Con ayuda de una pipeta de manejo de embriones se pasaron a otras gotas de hialuronidasa, para que la enzima actuase disgregando las células foliculares del *cúmulo* que los rodean. Tras esto, se lavaron en microgotas de medio M2 y posteriormente en placa abierta con medio de cultivo embrionario KSOM (*KSOM Mouse Embryo Culture Medium (1X) with AA & Phenol Red, GSM-5140, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France*) para después repartirlos en grupos de 25 embriones por microgota (30 μ L) de medio KSOM recubiertas de aceite mineral (SIGMA[®], M8410). Los embriones permanecieron en estas condiciones durante 2-3 días, desarrollándose en la estufa de CO₂ a 37°C hasta estadio de blastocisto.

3.3 Obtención de fetos

Las hembras preñadas se sacrificaron mediante dislocación cervical entre los días 8,5 a 17,5 de gestación contados a partir de la detección del tapón vaginal. Con ayuda de tijeras y pinzas se extrajeron ambos cuellos uterinos engrosados (**Fig. 4**), se depositaron en PBS y se rasgaron para liberar a los fetos. Se individualizaron en una placa con gotas de PBS y se observó la emisión de fluorescencia bajo la lupa al excitar con luz azul.

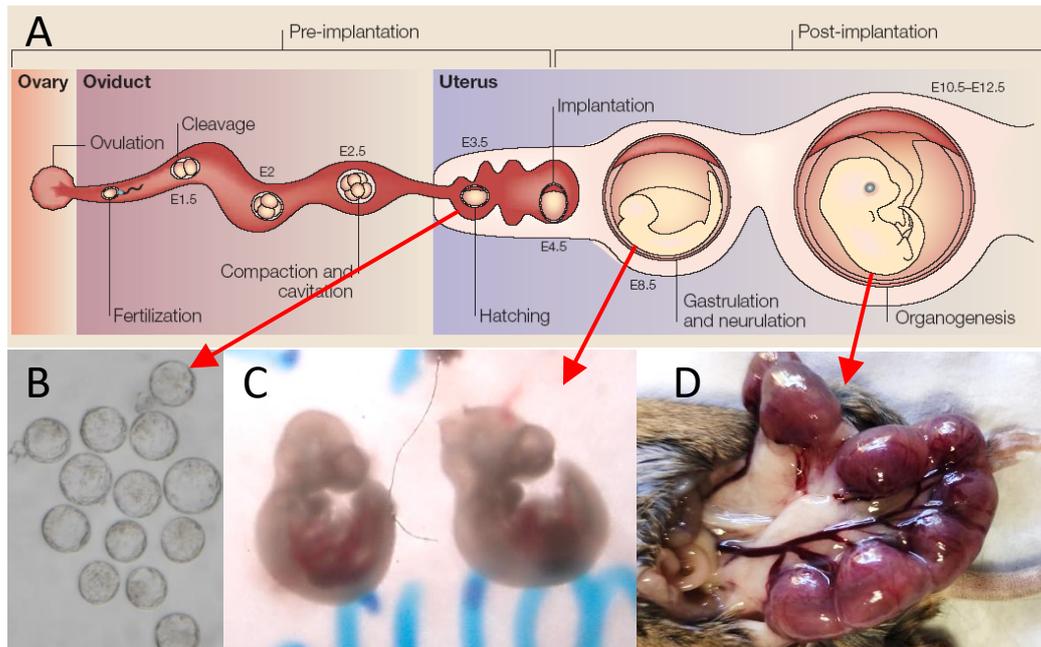


Figura 4. Esquema del desarrollo embrionario en ratón y de la localización en oviducto o en útero de cada estadio de desarrollo (A). Fotografías de los estadios analizados: (B) blastocistos, (C) fetos en gastrulación E9, y (D) fetos d13,5 en etapa de organogénesis.

3.4 Detección de la emisión de fluorescencia

3.4.1 Detección de fluorescencia en blastocistos y fetos

Para observar la expresión del transgén en los embriones en estadio de blastocisto y en los fetos de diferente día de desarrollo, se utilizó una lupa de fluorescencia (Nikon SMZ1500) conectada a una fuente LED (*light-emitting diode*) (Cooled pe-300). La placa con microgotas de KSOM que contenían los embriones o la placa con los fetos individualizados se depositaron bajo la lupa y se irradiaron con luz LED para excitar la GFP. Se anotaron qué blastocistos y fetos presentaban mucha, poca o ninguna fluorescencia y se agruparon en tres categorías llamadas: verdes muy intensos (VMI), verdes poco intensos (VPI) y no verdes (NoV).

El criterio utilizado para agrupar a los animales en estas tres categorías fue cualitativo, es decir, dos operadores determinaron *de visu* de manera independiente la intensidad de fluorescencia percibida.

3.4.2 Detección de fluorescencia en ratones y tejidos YeGFP

Para determinar la expresión del transgén en animales y en sus tejidos se procedió a iluminar el animal completo o el órgano con una linterna de luz LED azul (Dino-Lite, Dunwell Tech, CA, USA) (**Fig. 5**) protegiéndose el operador con guantes y gafas de protección UV. Al igual que en el caso de la detección de fluorescencia en fetos y embriones, el criterio utilizado fue el mismo y se clasificaron los animales y tejidos en VMI, VPI y NoV.

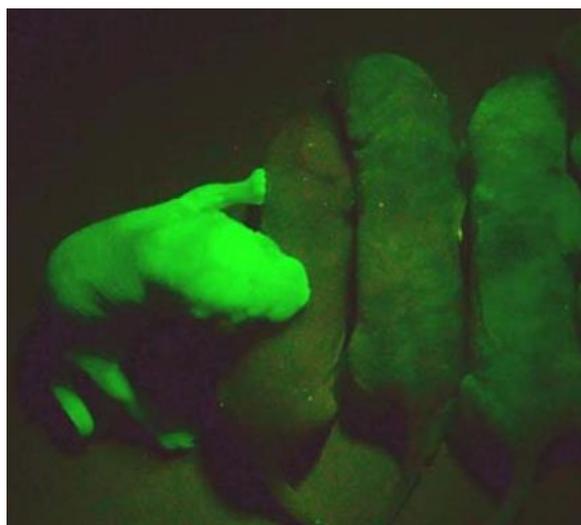


Figura 5. Emisión de fluorescencia de la descendencia de cruces de machos YeGFP con hembras WT por monta natural iluminados con linterna de luz LED azul. Se observa un macho VMI a la izquierda y los dos machos de la derecha son VPI.

3.5 Congelación de embriones

Tras observar la fluorescencia de los embriones bajo la lupa, se congelaron para posteriormente determinar su sexo por PCR. Para ello, con ayuda de una pipeta de manejo de embriones se pasaron desde las microgotas de KSOM a tubos de 200 μ L que contenían 6 μ L de agua destilada y se congelaron a -20°C hasta su posterior uso.

3.6 Identificación del sexo

Para poder descartar a las hembras, que no son portadoras del transgén, y trabajar con los machos fue necesario el sexado de la descendencia.

3.6.1 Observación de genitales en ratones recién nacidos y adultos

Para determinar el sexo de ratones adultos, se observa la distancia ano-genital, que es el doble en machos que en hembras (**Fig. 6**). En el caso de ratones recién nacidos, en machos se observa la presencia de una mancha negra en zona dicha zona.

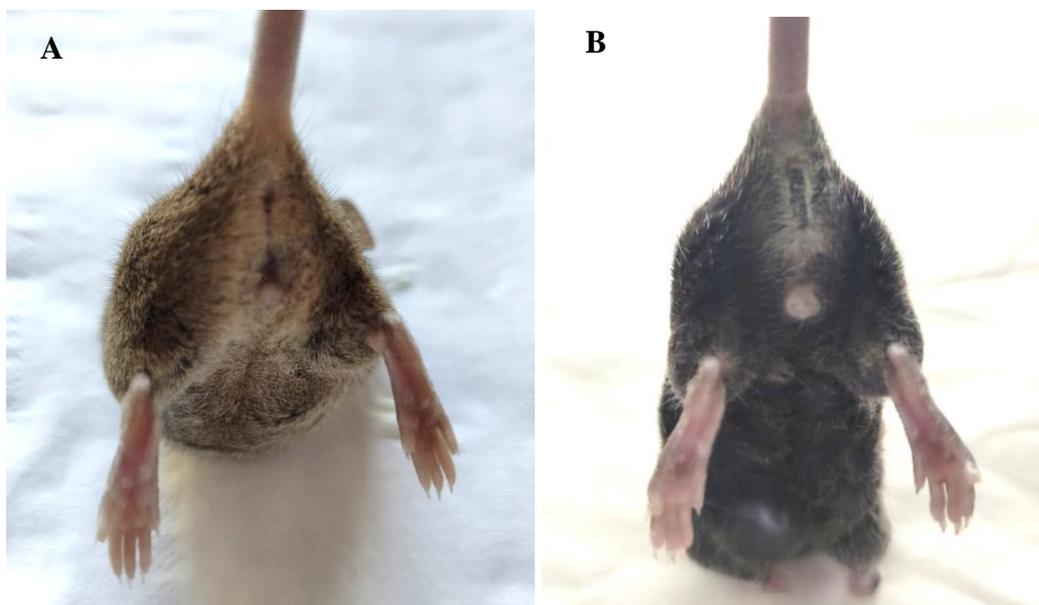


Figura 6. Distancia ano-genital en ratones, hembra (A) y macho (B) adultos.

3.6.2 PCR para el sexado de embriones y fetos de desarrollo temprano

En el caso de los embriones y fetos tempranos (hasta día 11,5), donde no es posible determinar el sexo a simple vista, fue necesario realizar PCR de sexado. Para ello, las muestras se sometieron previamente a una lisis celular para extraer el DNA del núcleo.

En el caso de los embriones, almacenados en el congelador en tubos de 200 μL a la espera de su sexado, se añadieron 5 μL de buffer 50 mM NaOH-0,4 mM EDTA y se sometieron a lisis térmica en el termociclador *T series Multi-Block Thermal Cycler* (LongGene[®]) durante diez minutos a 95°C, tras lo que se añadieron 5 μL de buffer de neutralización 40 mM Tris-HCL (pH=5).

Las PCR se realizaron en 25 μL , conteniendo 16 μL de ADN molde, 5 μL de *buffer* (5X Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer, Promega), 0,2 μL del *primer 1* (que amplifica la secuencia repetida del chr-X Sstx) (**Tabla 1**), 0,5 μL del *primer 2* (que amplifica una secuencia repetida del chr-Y, DyzEms3) (**Tabla 1**), 0,25 μL de dNTPs 10 mM (Biotools,

Madrid), 0,2 μL de polimerasa 5 U/ μL (*GoTaq[®] G2 Flexi DNA polymerase, Promega*), 1,5 μL de MgCl_2 25mM (*MgCl₂, Promega*) y completar con H_2O (*Nuclease-Free water, Promega*). Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador *T series Multi-Block Thermal Cycler (LongGene[®])* con las condiciones: 94°C 3 minutos, 60°C 40 segundos, 72°C 15 segundos, 36 ciclos (desnaturalización 10 seg a 94°C, hibridación 30 segundos a 60°C, elongación 10 seg a 72°C), 72°C durante 5 min y conservación a 12°C. Los productos de PCR se corrieron, mediante electroforesis, en geles de agarosa al 3% en tampón TBE 0,5X (Tris-borato y EDTA) y *Safe View* (Tinte de gel de ADN *SYBR[™] Safe, Invitrogen[™]*) y para ello se añadió a cada muestra 2,5 μL de *buffer* de carga 10X (Bromofenol 0,2%, Xileno Cianol 0,2%, glicerol 30%). La presencia de una banda en el gel indica que la muestra es hembra y de dos bandas indica que es macho. Se utilizaron como controles positivos muestras de macho y hembra a concentraciones de 1 ng/ μL y 0,1 ng/ μL .

Para el sexado de fetos se partió de un fragmento del cuerpo extraído con ayuda de unas pinzas y se siguió el mismo protocolo de lisis que en el caso de embriones, pero añadiendo al tubo de PCR de 200 μL un volumen de reactivos de lisis y neutralización de 15 μL cada uno. Tras la lisis, se midió la concentración de ADN de la muestra y su pureza en un espectrofotómetro (*Eppendorf BioPhotometer[®]*) y se realizaron las diluciones correspondientes para conseguir una concentración de ADN de 4 ng/ μL , que es la óptima para la amplificación por PCR.

3.6.3 Identificación del anillo germinal

En el caso de fetos a partir del día 12,5 se determinó el sexo mediante el reconocimiento anatómico de estructuras primigenias de testículos y ovarios (anillos germinales). Para ello, con ayuda de unas pinzas se extrajo el anillo germinal y dependiendo de su morfología se determinó si el feto era macho o hembra (**Fig. 7**).



Figura 7. Anillos germinales de fetos de 12,5 días. A la izquierda el anillo germinal corresponde a una hembra y a la derecha el de un macho.

3.7 Metilación de líneas de fibroblastos embrionarios (mEF) de ratones YeGFP

Con el fin de desvelar el mecanismo responsable de la variabilidad en la intensidad de expresión del transgén eGFP en los ratones, se llevó a cabo el análisis de la metilación de una región de 648 pb del chr-Y con un alto contenido en CpG, que comprendía una parte de la secuencia codificante de la eGFP. Esta región se identificó utilizando el programa online EMBOSS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/).

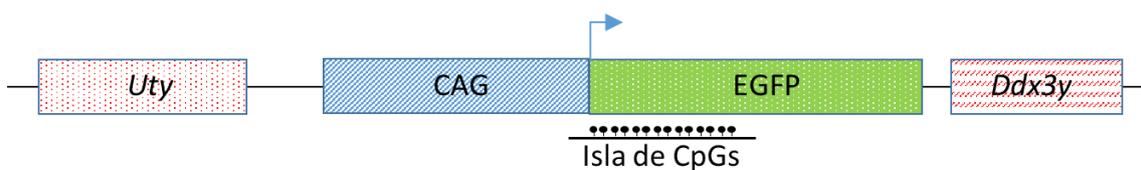


Figura 8: Esquema representando el transgén introducido entre los dos genes del chr-Y y señalando en negro la región rica en CpGs donde se analiza la metilación.

3.7.1 Cultivo de MEFs, extracción de ADN y tratamiento con bisulfito

Se realizó un cultivo primario de fibroblastos a partir de fetos YeGFP NoV, VPI y VMI de día 12,5 de desarrollo (n=4 fetos de cada grupo). Se descartaron la cabeza y los órganos internos del feto y se tomó tejido procedente de la carcasa exterior del mismo en

un tubo de 2 mL, para después trocearlo con ayuda de unas tijeras y realizar la digestión enzimática con tripsina (2 veces) para individualizar las células. Bajo campana de flujo laminar, se añadieron 2 mL de 0,05% tripsina (SIGMA[®])-DMEM (GIBCO[®]) a cada tubo y se dejaron durante 10 minutos en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Para bloquear el proceso de tripsinización se añadieron 1,5 mL de medio de cultivo de fibroblastos, compuesto por un 10% FCS (*fetal calf serum*), 1% penicilina, 1% estreptomina y DMEM. Se centrifugó durante 5 minutos a 300g y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a añadir medio de fibroblastos y se transfirió a una placa de cultivo para incubarlo a 37°C durante 24 horas hasta que alcanzaron la confluencia. En este punto, los mEFs se pudieron, o bien congelar utilizando métodos estándar para la crioconservación de células de mamíferos, o bien extraer su ADN. Para ello, se utilizó el *Minikit FavorPrepTM Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit* (FAVORGEN[®], Biotech corp.) y se midió la concentración de la muestra en el espectrofotómetro.

Para el tratamiento de las muestras de DNA con bisulfito se siguió el protocolo de *Thermo Scientific EpiJET Bisulfite Conversion Kit* (#K1461). Se añadieron 20 µL de muestra de ADN a una concentración de entre 10 y 25 ng/µL en un tubo de 200 µL junto con 120 µL de reactivo de modificación y se mantuvieron en el termociclador a 98°C 10 minutos y a 60°C 150 minutos. Mediante la reacción con bisulfito todas las citosinas no metiladas se desaminaron y se convirtieron en uracilos mientras que las citosinas metiladas permanecieron intactas. Para purificar la muestra tratada con bisulfito se añadieron los correspondientes *buffers* indicados en kit mencionado anteriormente hasta conseguir la elución del ADN 10 µL. Tras el tratamiento, las secuencias fueron amplificadas por PCR y los uracilos se convirtieron en timinas. La reacción de amplificación se realizó mediante una *nested* PCR; en la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores 3 (Tabla 1) y se realizó en 25 µL conteniendo 2 µL de ADN molde a una concentración de 30 ng/µL, 5 µL de buffer, 0,5 µL de primers, 0,25 µL de dNTPs 10 mM, 0,1 µL de polimerasa 5 U/ µL, 2 µL de MgCl₂ 25mM y H₂O. Las condiciones fueron 95°C 2 minutos y 35 ciclos (desnaturalización 15 segundos a 95°C, hibridación 25 segundos a 54°C, elongación 25 segundos a 72°C), 72°C durante 15 min y conservación a 12°C. Seguidamente se realizó la segunda ronda de amplificación con las mismas condiciones de PCR con los cebadores 4 (Tabla 1), añadiendo 10 min de extensión en el paso final que dejó el fragmento con extremos de timina cohesivos preparados para la clonación en el vector.

3.7.2 Clonación

- Ligación del inserto en el vector

El producto de PCR se ligó a 20 ng de un vector pMD20 (T-Vector pMDTM20 de Takara[®]) en un tubo de 1,5 mL usando una relación molar vector-inserto de 1:3. Se añadieron 4,5 µL de buffer de ligación con ligasa Blunt/TA (Master Mix 2X #MO367L, New England BioLabs[®] Inc.) y se incubó a 25°C durante 15 minutos.

- Transformación

A continuación, se introdujo el plásmido recombinante obtenido en la reacción de ligación en la cepa de *Escherichia coli* DH5α, que está modificada genéticamente de manera que es posible inducir en laboratorio la competencia de las células y mantener el plásmido de forma estable en su interior.

En un tubo de 1,5 mL y en condiciones de esterilidad se añadieron 3 µL del producto de ligación sobre 50 µL de células competentes de DH5α (Promega) y se mantuvieron 30 minutos en hielo. Tras esto, se sometió a las células a un choque térmico de 30 segundos a 42°C en un baño termostatzado y se dejaron enfriar en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 900 µL de medio de cultivo enriquecido SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Se centrifugó el tubo a 1500g durante 7 min y por decantación se eliminó el sobrenadante. Los aproximadamente 100 µL restantes se sembraron en placas LB con 25 µl ampicilina (100 µg/mL) (Sigma), 50 µL IPTG (0,1M, Panreac) y 50 µL X-Gal (20 ng/µl, Panreac) con ayuda de un asa de siembra y se dejó incubar toda la noche en una estufa (JP SELECTA[®]) a 37°C.

- PCR colonia

Al día siguiente se observaron en la placa colonias blancas y azules seleccionadas por resistencia a ampicilina, ya que ambos tipos de bacterias portan el plásmido. Las colonias azules correspondían a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la β-galactosidasa funcional y produce por inducción con IPTG dicha enzima capaz de hidrolizar al X-Gal y generar color azul. Las colonias blancas correspondían a las células transformadas con el vector que contiene el gen de la β-galactosidasa no funcional por inserción del fragmento de DNA de interés dentro del mismo.

Se picaron aproximadamente diez colonias blancas por placa bajo la lupa con ayuda de una pipeta y se cultivaron en medio líquido LB con ampicilina durante 24 horas a 37°C en agitación. Tras esto, se realizaron PCRs de colonia para confirmar que las bacterias contenían la construcción de interés.

Para ello, previamente se realizó una lisis térmica en el termociclador durante 10 minutos a 95° C y se centrifugaron los tubos de cultivo para precipitar los restos celulares. Las PCRs de colonia se realizaron en 25 µL, conteniendo 2 µL de ADN molde obtenido del sobrenadante, 5 µL de *buffer*, 0,5 µL de los *primers* 5 (Tabla 1), 0,25 µL de dNTPs 10 mM, 0,1 µL de polimerasa 5 U/ µL, 2 µL de MgCl₂ 25mM y H₂O. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador con las condiciones: 95°C 2 minutos y 36 ciclos (desnaturalización 15 segundos a 95°C, hibridación 25 segundos a 54°C, elongación 25 segundos a 72°C), 72°C durante 5 min y conservación a 12°C. Los productos de PCR se corrieron mediante electroforesis, en geles de agarosa al 3% a 250 V en tampón TBE 0,5X y *Safe View* y para ello se añadió a cada muestra 2,5 µL de *buffer* de carga. Se utilizó como patrón un Ladder de 100 pb (iNtRON Biotechnology) y dos controles negativos: la máster mix sin muestra y ADN procedente de una colonia azul. Se seleccionaron las muestras cuyo tamaño de banda correspondía con los pares de bases (163 pb vector + 648 pb del inserto = 811 pb) correspondientes al vector con el inserto.

3.7.3 Purificación y secuenciación

Para la extracción del plásmido del cultivo bacteriano se llevaron cabo minipreps de lisis alcalina siguiendo el protocolo FavorPrepTM cPlasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN[®], Biotech corp.) con cada tubo de cultivo bacteriano positivo para el vector recombinante. Tras la elución del ADN plasmídico se cuantificó la concentración de cada muestra en el espectrofotómetro esperando una concentración superior a 100 ng/µL y se mandaron a secuenciar en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense (CAI Técnicas Biológicas, Madrid) empleando los cebadores nº 5 de la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Primers* utilizados para las PCRs.

Identificador cebadores	Nombre	Cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i>	Secuencia detectada	Tamaño amplicón (pb)
1	Sstx F1 Sstx R1	F: GCCCTGCCCAAAAGGAACATC R: ACTGGCACCTGATCCAGCACAG	<i>Sstx</i>	107
2	211/ 212	F: TAGGATGGTAAGCCCAATGC R: TTGGTTGGTTAATTGTTTGGG	<i>DYzEms3</i> (solo ♂)	254
3	Cybi2 F3 Cybi2 R4	F: TTTTTTTTGTGAAATAAGTAGGGGAT R: AAAAAATAACACCTTCCAAAATCAAAAAA	<i>EGFP</i>	875
4	Cybi2 F33 Cybi2 R44	F: TTGGTTGAGTTGGATGGTGATGTAATG R: AATAATCCCAACAACAATCACAAACTCC	<i>EGFP</i>	648
5	M13 F1 M13 R1	F: TGTAACACGACGGCCAGT R: GTTTTCCCAGTCACGAC	Vector <i>pMD20</i>	163 + inserto

3.8 Fecundación *in vivo*

Para obtener de descendencia procedente de monta natural de ratones YeGFP y determinar si la transmisión del transgén afecta a la proporción de sexos, se cruzaron hembras WT con machos Tgs YeGFP, con intensidad de fluorescencia diferente y conocida. Tras las PCRs de sexado se anotó el número de machos y hembras de los embriones extraídos de ampulla o al nacimiento, tras el periodo de gestación de aproximadamente 21 días, se anotó el sexo de las crías obtenido en cada cruzamiento.

3.9 Fecundación *in vitro* (FIV)

De la misma forma, para analizar la transmisión de transgén y determinar si afecta a la proporción de sexos *in vitro*, se realizó FIV con ovocitos de hembras WT y espermatozoides de machos Tgs YeGFP, con intensidad de fluorescencia diferente y conocida.

3.9.1 Obtención de espermatozoides de ratón para FIV

Para la obtención de semen fresco se utilizaron cinco machos YeGFP con alta expresión de eGFP y cinco machos WT como control, previamente individualizados. Los machos se sacrificaron por dislocación cervical y con ayuda de pinzas y tijeras se extrajeron los conductos deferentes junto con las colas de epidídimo y se depositaron y limpiaron de grasa en el medio M2. Posteriormente el epidídimo y vaso deferente se trasladaron a una placa de 35 mm una gota de 500 μL de HTF (Quinn *et al.*, 1985) para que se equilibrara (pH medio sea próximo a 7,4), se cubrió con aceite mineral y se mantuvo en un incubador (Heracell[®] 150) a 37°C y 5% CO₂ hasta su posterior uso. A continuación, en dicha gota se llevó a cabo la extracción del esperma, para ello, con ayuda de unas pinzas, se empujó desde la cola del epidídimo hacia el vaso deferente y con unas tijeras o bisturí se troceó la cola del epidídimo. Se incubó durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y saturación de humedad y, tras la dispersión de la masa espermática, se recogió con ayuda de una pipeta 50 μL de la superficie y se procedió a la valoración de la motilidad y recuento de la concentración espermática.

3.9.2 Cálculo de la concentración espermática

Para calcular la concentración de spz se realizó una dilución 1:50 en agua destilada de la muestra de esperma recuperada de la gota de fecundación. Se cargaron 18 μL en la cámara Thoma y en con el objetivo 10X del microscopio (Nikon Eclipse E400) se contaron los spz enteros en los dieciséis cuadrados elegidos. Se calculó la concentración espermática a razón de la fórmula:

$$N^{\circ} \times F \times 10^4 = spz/mL$$

N^o= Recuento de spz en 16 cuadrados

F= factor de dilución de la muestra

3.9.3 Obtención de ovocitos y FIV

Previamente al procedimiento de FIV, se superovularon las ratonas tal y como se mencionó anteriormente. Se extrajeron los ovocitos 13,5-15 horas después de la inyección con hCG y se realizó la fecundación inmediatamente para evitar el endurecimiento de las zonas pelúcidas. Para cada FIV, se sacrificaron tres o cuatro hembras (de 100 a 200 ovocitos) por dislocación cervical, se extrajeron sus oviductos y aislaron los complejos cúmulo-ovocito (COCs) mediante rasgado de ampulla. En este caso no se digirieron los

cúmulos con hialuronidasa, sino que se repartieron aproximadamente 35 o 40 ovocitos en cada pocillo de fecundación en una placa *Nunclon™ Delta Surface (Thermo Scientific)* con medio HTF equilibrado. Posteriormente, en cada pocillo se añadió el volumen de esperma necesario para obtener una concentración correspondiente a 10 millones spz/mL (aproximadamente 50 μ L). La FIV se mantuvo durante 4-5 horas en el incubador a 37°C y 5% CO₂ tras lo que los ovocitos se lavaron en placa abierta de HTF y de KSOM para posteriormente dejar en cultivo en microgota de KSOM cubierta con aceite mineral. Se evaluó la tasa de división a dos células, el desarrollo a blastocisto y la fluorescencia en este estadio. Los blastocistos se congelaron a -20°C para su posterior sexado por PCR.

3.10 Estudio de la motilidad espermática mediante CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*)

A partir de las muestras de esperma recogidas de la cola del epidídimo y conducto deferente de cada animal, se realizaron diluciones 1/10 en medio HTF. Se pipetearon 6 μ L del esperma diluido en la cámara *Mackler* y con el objetivo 10X del microscopio Nikon Eclipse 50i (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Basler A312f (Basler AG, Ahrensburg, Alemania) se observó la motilidad de los spz. Para ello se utilizó el programa CASA que cuenta con el software ISAS (*Integrated Semen Analysis System*; Projectes i Serveis R+D S.L., Valencia, España) y de cada muestra se realizaron varias réplicas de 5 grabaciones de 1 segundo (15-20 spz en movimiento por grabación) capturando diferentes campos de la superficie de la gota. El proceso de grabación se realizó durante los 20 primeros segundos tras la colocación de la muestra sobre la cámara *Mackler*. El programa CASA generó dos archivos Excel de cada muestra analizada, “*data*” y “*report*”, a partir de los cuales se calcularon todas las variables cinemáticas de los spz capturados en las cinco grabaciones realizadas por cada muestra. Previamente al análisis de los datos se revisaron cada una de las grabaciones para eliminar trayectorias erróneas que el programa seleccionó automáticamente como es el caso de trayectorias detectadas de gotas lipídicas y no de la cabeza del espermatozoide, trayectorias superpuestas a otra del mismo espermatozoide o trayectorias de spz adheridos a la placa y que no se desplazan, sino que se mueven sobre su mismo eje.

Una vez obtenido los datos de cada muestra, además de analizar la motilidad (porcentaje total de spz en movimiento), se analizaron variables cinemáticas (**Fig. 9**): velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), correspondiente a la distancia en línea recta desde el

primer punto hasta el último punto de su trayectoria; velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), es la distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide en toda su trayectoria; velocidad media (VAP, $\mu\text{m/s}$), se determina a partir de la distancia recorrida por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria media de circulación; amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm), definida como la medida de la anchura de oscilación de la cabeza de los spz que nadan; frecuencia de batido (BCF, Hz), definida como la frecuencia de cortes de la línea de trayectoria por la cabeza del espermatozoide; la motilidad (%), que es el porcentaje de spz móviles y móviles progresivos, correspondientes a spz que nadan rápidamente hacia adelante en línea recta (evaluados como índice de rectitud $\geq 45\%$; $VAP \geq 25 \mu\text{m/s}$).

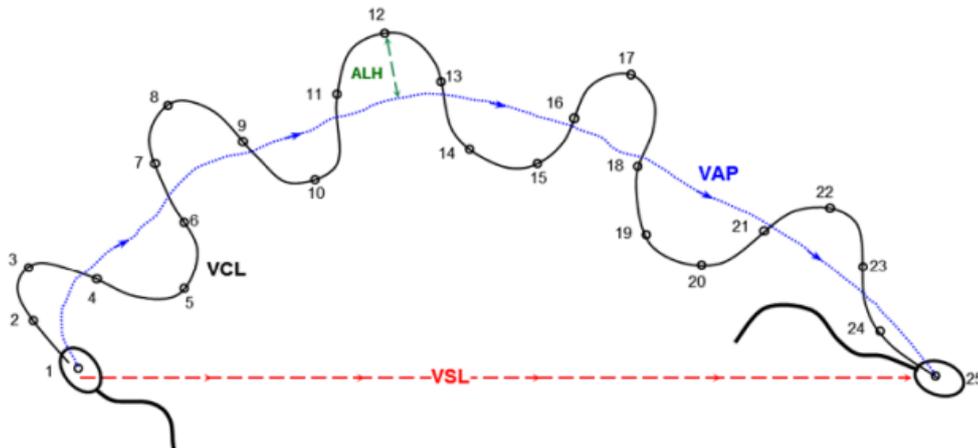


Figura 9. Parámetros cinéticos determinados por los equipos CASA en el análisis de motilidad espermática

Además, se calcularon tres relaciones de progresión, expresadas en porcentajes, a partir de las mediciones de velocidad descritas anteriormente: índice de linealidad (LIN) que es relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea [$LIN = (VSL / VCL) \times 100$], índice de rectitud [$STR = (VSL / VAP) \times 100$] e índice de oscilación que es la relación porcentual entre la velocidad media y la velocidad rectilínea [$WOB = (VAP / VCL) \times 100$] (Valverde *et al.*, 2021).

Después, con estos datos se realizó un *clustering* de subpoblaciones de spz en cuanto a motilidad mediante un *Principal Component Analysis* (PCA) y análisis estadístico que se explica en el apartado 3.11.

3.11 Análisis estadístico

Los resultados de emisión de fluorescencia de la descendencia en diferentes momentos de desarrollo se organizaron en tres grupos, “blastocisto”, “día 8,5 a 10,5” y “día 11,5 a 17,5”. Para analizar si había diferencias entre grupos, se comprobó la normalidad de los datos mediante *Saphiro Wilk* y alguno de los grupos no seguía una distribución normal, por lo que se realizó el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* para determinar si existían diferencias significativas entre grupos y después el test post hoc de *Wilcoxon Mann Whitney* para ver entre cuales de esos tres grupos existían diferencias. Cuando los datos seguían una distribución normal, se realizó una prueba ANOVA, analizando si existían diferencias entre la varianza de los tres grupos, y posteriormente, se hizo un análisis *post-hoc* Tukey para comparar entre qué grupos había diferencias en las medias. Se consideraron diferencias significativas con una $P < 0.05$. Los análisis se procesaron mediante el programa *GraphPad Prism9*.

Para el análisis de la metilación se utilizó la página web EMBOSS Cpplot (EMBL-EBI, UK) para representar gráficamente los sitios CpGs metilados y no metilados. Para hacer el análisis se anotó en Excel para cada grupo de animales (NoV., VPI, y VMI), el porcentaje de no metilación por posición de cada línea y se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante el test de *Saphiro Wilk* y el test de *Levene* respectivamente. Se realizó un test de *Kruskal-Wallis* para determinar si existían diferencias significativas entre grupos y después el test post hoc de *Wilcoxon Mann Whitney* para ver entre cuales de esos tres grupos existían diferencias. Para representar gráficamente los resultados se elaboró un *heatmap*. Se consideró significación estadística en $P < 0,05$ y los datos se analizaron utilizando *Rstudio* para Windows.

Los análisis de la transmisión del transgén en la descendencia tanto *in vivo* como *in vitro* se realizaron con los datos de machos y hembras obtenidos de cada cruzamiento y fueron expresados como media \pm error estándar de las medias (SEM). Se determinó la normalidad de las muestras mediante el método *Kolmogorov-Smirnov* y, al ser una distribución normal, las medias fueron comparadas y analizadas por la prueba t de Student mediante el programa *GraphPad Prism9*. La significación estadística se estableció con un nivel de confianza del 95%.

Para el análisis de la motilidad espermática, se determinó la normalidad y la homocedasticidad de los datos obtenidos de las ocho variables cinemáticas medidas en el CASA mediante las pruebas de *Shapiro-Wilk* y *Levene*. Se realizaron procedimientos

multivariados para identificar subpoblaciones de spz a partir del conjunto de datos de motilidad de los spz. Todos los valores de las variables cinemáticas se estandarizaron para evitar cualquier efecto de escala y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de estos datos para reducir el número de variables cinemáticas a componentes principales (PC) que contienen un alto porcentaje de la varianza total a partir del criterio de Kaiser, es decir, seleccionando solo aquellos con un valor propio (varianza extraída de cada PC) > 1 . Se realizó un análisis multivariado de conglomerados de k-medias para clasificar los spz en un número reducido de subpoblaciones (*clusters*) según sus variables cinemáticas. Se aplicó un ANOVA para evaluar las diferencias estadísticas en las distribuciones de las observaciones (spz individuales) dentro de las subpoblaciones y luego se utilizó un procedimiento de modelo lineal generalizado (GLM) para determinar los efectos sobre los valores medios de las variables cinemáticas que definen las diferentes subpoblaciones de spz. Las diferencias entre medias se analizaron mediante una prueba t-test. Se consideró significación estadística en $P < 0,05$. Todos los datos se analizaron utilizando *Rstudio* para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de la expresión del transgén

En el análisis de emisión de la fluorescencia los datos utilizados fueron exclusivamente de la descendencia de ratones macho, ya que son los que contienen el transgén. Por tanto, previamente fueron sexados tal y como se ha indicado en el apartado de “material y métodos” y se descartaron a las hembras.

4.1.1 Variaciones del fenotipo en la descendencia

Cuando se analizó la descendencia de los Tgs YeGFP se observó que ésta mostraba una expresión variable del transgén. Algunos de los animales no expresaban eGFP y otros mostraban una expresión alta, por lo que los ratones se agruparon en tres categorías en función de la intensidad de la expresión de eGFP: los que no tenían expresión se denominaron no verdes (NoV); verdes, pero con una intensidad baja o poco intensa (VPI); y los verdes muy intensos (VMI).

Cinco animales de cada categoría se cruzaron con hembras WT y se analizó el fenotipo en la siguiente generación. Como se observa en la **Figura 10**, los machos YeGFP con alta expresión del transgén transmitían preferencialmente el carácter alta expresión de eGFP a la descendencia (63% eran VMI), pero también tuvieron descendencia con baja (VPI) o nula (NoV) expresión (27% y 10% respectivamente). Los ratones con media expresión (VPI) tuvieron una descendencia similar de VMI, VPI y NoV (33%, 28% y 39% respectivamente). Finalmente, toda la descendencia de los machos YGP que no expresaban eGFP eran también no verdes. Estos resultados sugerían que se estaba produciendo un control epigenético de la variación fenotípica de la descendencia, por lo que decidimos analizar la expresión y transmisión del transgén durante el desarrollo embrionario y fetal.

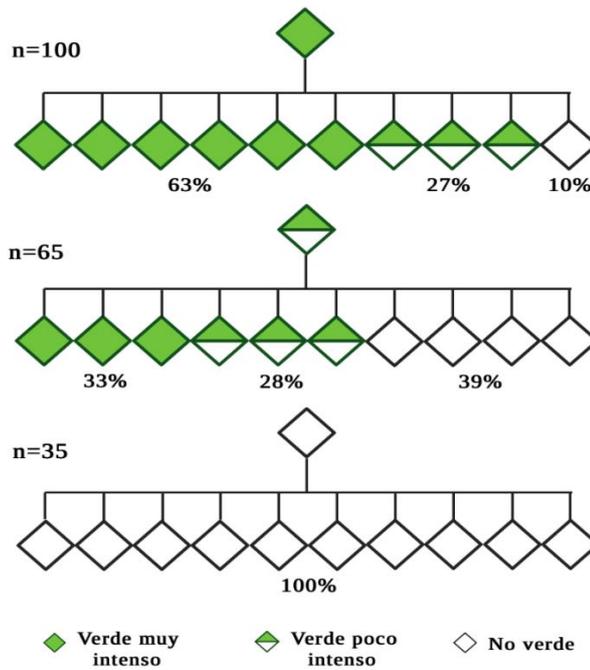


Figura 10. Diagrama de pedigrí de padres YeGFP de fluorescencia conocida.

En la **Figura 11** se muestra un ejemplo de cómo se observan los blastocistos producidos por machos YeGFP. Se observa que los embriones hembra son no fluorescentes, y las intensidades entre VMI y VPI son fácilmente distinguibles (**Fig. 11c, d**)

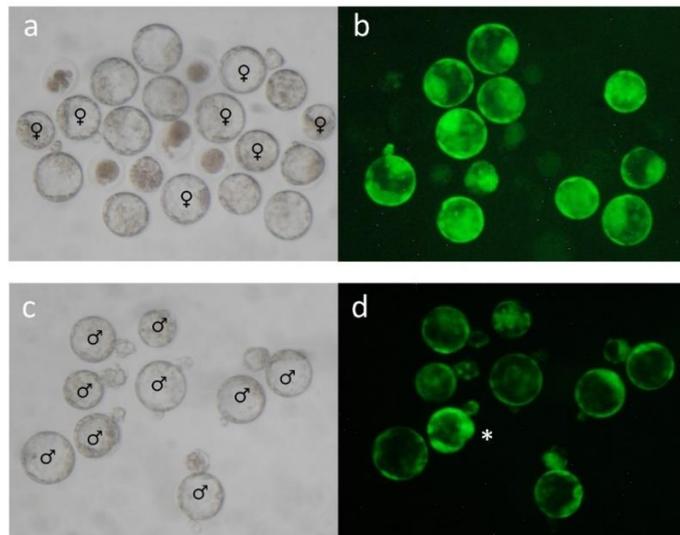


Figura 11. Imágenes de los blastocistos YeGFP. En las fotografías **a** (campo claro) y **b** (fluorescencia) se muestran los blastocistos machos y hembras producidos con esperma de machos VPI o VMI. En **c** (campo claro) y **d** (fluorescencia) se muestran blastocistos machos producidos por esperma de machos NoV. En **d** se muestra con un asterisco el embrión con alta expresión del transgén comparado con el resto de poca expresión.

4.1.2 Análisis de la emisión de fluorescencia durante el desarrollo fetal

Tal y como se aprecia en la **Figura 12**, en la descendencia de padres NoV en estadio de blastocisto todos ellos emiten fluorescencia “poco intensa” y en menor porcentaje “muy intensa”, pero en la etapa de gastrulación del desarrollo fetal no hay expresión de la eGFP y este estado “no verde” se mantiene durante el resto del desarrollo y vida del ratón.

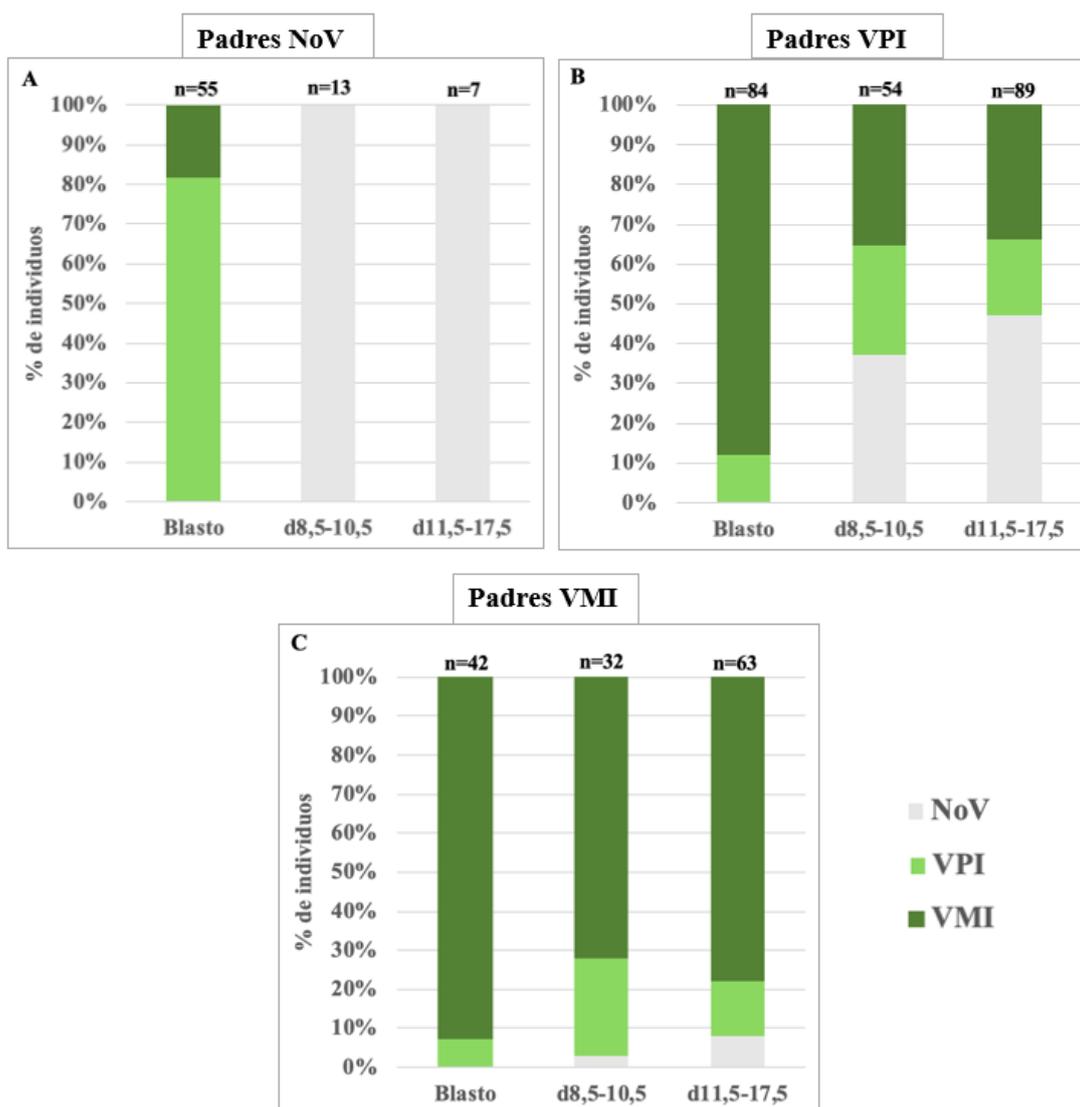


Figura 12. Análisis de la expresión del transgén durante el desarrollo fetal. A. Descendencia de padres no verdes. B. Descendencia de padres verdes poco intenso. C. Descendencia de padres verdes muy intenso.

En el caso de la descendencia de padres VPI se observa que en estadio de blastocisto la mayoría emiten fluorescencia VMI pero existe una disminución significativa en el número de fetos VMI de día 8,5-10,5 por lo que podemos afirmar que en algún momento entre ese periodo del desarrollo embrionario, el transgén deja de expresarse, y se mantiene en ese estado durante el resto del desarrollo, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de individuos del segundo y del tercer grupo de edad. Por otro lado, el grupo de descendencia VPI experimenta un aumento significativo en el segundo grupo de edad en comparación con los blastocistos y se mantiene constante en el grupo de día 11,5-17,5, lo que corrobora que existe un apagado del transgén en esta etapa del desarrollo. La progenie del grupo NoV aparece por primera vez en el segundo grupo de edad, una vez el transgén ya se ha dejado de expresar y no existe diferencia con el porcentaje de descendencia NoV del tercer grupo.

En cuanto a los padres VMI se observa que en su descendencia del grupo de blastocistos, casi un 93% de los embriones son VMI y existe una disminución significativa de este porcentaje en el segundo grupo de edad, que se mantiene sin diferencias estadísticamente significativas en el tercer grupo de edad. El porcentaje de blastos VPI tiende al alza y se observa un 25% de fetos de día 8,5-10,5 pero no existen diferencias significativas entre este grupo y el siguiente grupo de edad de día 11,5-17,5. En este caso, el porcentaje de animales NoV aparece también en el segundo grupo pero el porcentaje de este tipo de animales es muy bajo y no existen diferencias significativas entre los grupos de edad, pero sí que corrobora el hecho de que en la fase de desarrollo entre día 3,5 y 8,5, justo antes de la gastrulación, el transgén en algunos animales deja de expresarse, siendo este el momento clave desde donde se estabiliza la expresión.

4.2 Análisis metilación

El análisis de la metilación de una región CpG del transgén mostró una correlación inversa con su expresión. Para que gráficamente los resultados fueran más visuales se trabajó con el porcentaje de no metilación, que podemos equiparar a “expresión” del transgén.

Tal y como se observa en la **Figura 13** se puede observar que los machos NoV muestran un porcentaje de sitios CpGs no metilados bajo (14,63%), por lo que no expresan eGFP y esto explicaría que no se observe fluorescencia verde. Los machos VPI

tienen un 20,15% de CpGs no metilados y existen diferencias significativas con el grupo de machos VMI que poseen un 36,17% de no metilación. Esto explica que los machos VMI expresan más el transgén y por tanto emiten mayor fluorescencia que los machos VPI que tienen un porcentaje de no metilación menor.

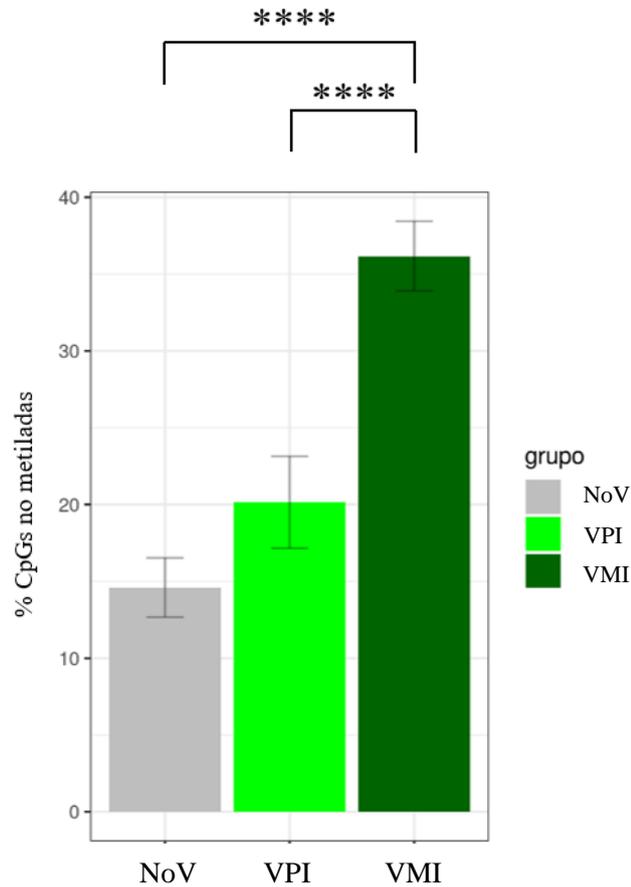


Figura 13. Análisis de la metilación del transgén en los diferentes grupos de animales Tgs: NoV, VPI y VMI. (B) *Heatmap* del porcentaje de metilación de cada CpG en los tres grupos de animales Tgs (verde muy intenso, poco intenso y no verde).

Los resultados de no metilación también se representaron en un *heatmap* (**Figura 14**) para analizar si había algún grupo de CpGs, de los presentes en la región analizada, que fuera importante para el control de la expresión del transgén. Se observan los CpGs específicos que están metilados (color amarillo) o no metilados (color rojo) de cada grupo de animales transgénicos y las diferencias entre grupos. Se observa en los animales VPI un grupo de CpG no metilados que podrían estar implicados en el control de la expresión del transgén, y ser la causa de la diferencia de fenotipo que se observa entre los grupos NoV y VPI a pesar de que ambos grupos tienen el mismo porcentaje de metilación.

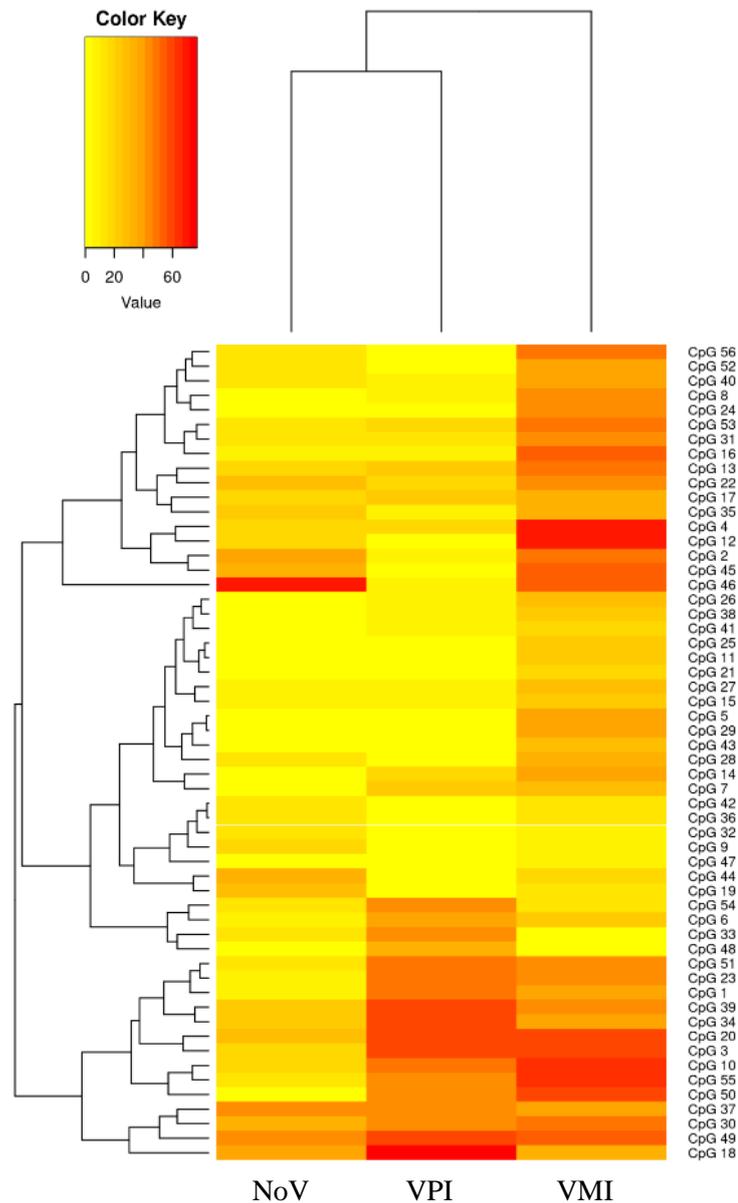


Figura 14. *Heatmap* del porcentaje de metilación de cada CpG en los tres grupos de animales Tgs (verde muy intenso, poco intenso y no verde).

4.3 Análisis de la emisión de fluorescencia en tejidos del Tg YeGFP adulto

En relación a la expresión de eGFP en tejidos se observó la emisión de fluorescencia de diferentes tejidos (cerebro, pulmón, corazón, bazo, músculo, cola, hígado, cráneo, riñón y testículo) de machos Tgs adultos YeGFP de la categoría VMI. La emisión de fluorescencia se compara con la de machos de la línea Tg XeGFP (Okabe *et al.*, 1997) y con ratones WT. Se observó expresión intensa de eGFP en todos los tejidos excepto de bazo y cráneo y una expresión poco intensa en cola, riñón y pulmón (**Fig. 15**). Es destacable también que la expresión en testículo es mayor en los individuos que portan

eGFP en el chr-Y que en los que lo llevan en el X. Esta expresión diferencial en los tejidos de los Tg YeGFP puede deberse a que en dichos tejidos no se exprese el chr-Y, o bien no se exprese la región donde se ha introducido el transgén.

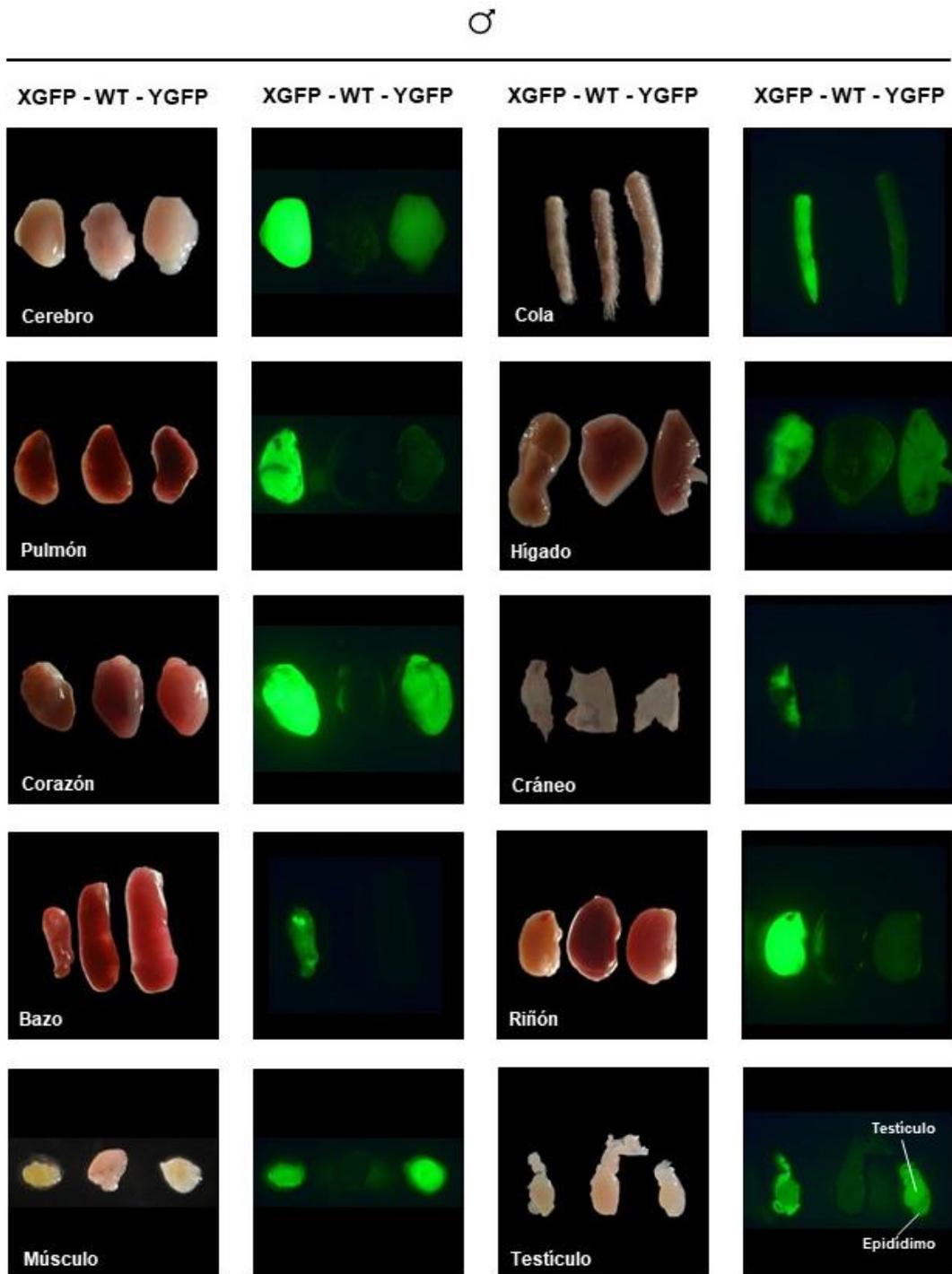


Figura 15. Imágenes en campo claro y fluorescencia mostrando la expresión de eGFP en distintos órganos de los ratones machos WT y Tgs. En cada imagen se sitúa a la izquierda la muestra de un ratón Tg XeGFP, en medio un WT y a la derecha la de un ratón YeGFP.

Además, sorprendentemente, la fluorescencia de los Tgs YeGFP en la piel es tipo mosaico (**Fig. 16**), similar a la observada en las hembras que portan una copia en hemicigosis de un transgén eGFP ligado al X (debido a la inactivación de un chr-X), y muestran herencia clonal del estado activo o inactivo a través de la división celular. La expresión en mosaico de la piel del YeGFP indica que la elección por parte de la célula de que su chr-Y permanezca activo o inactivo se mantiene estable y se hereda clonalmente. El mosaicismo se produce porque durante el desarrollo, el linaje de melanocitos que recubre la piel se origina de células madre que desde la parte dorsal se dividen por los lados hacia la parte ventral; de tal forma que todas las células que se originan de la célula madre heredan el grado de expresión de la célula progenitora.

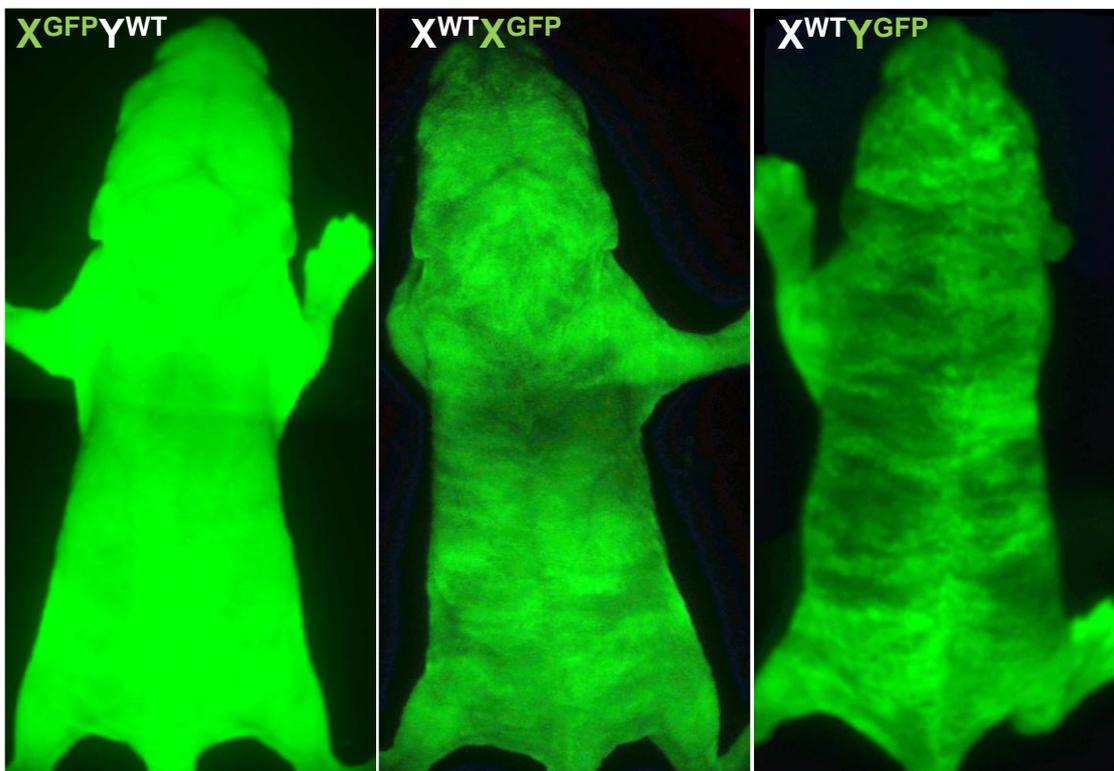


Figura 16. Emisión de fluorescencia homogénea o en mosaico de tres crías de ratón; de izquierda a derecha: un macho y una hembra heterocigotos de la línea X^{eGFP}, y un macho de la línea Y^{eGFP}.

4.4 Análisis de la transmisión del transgén por fecundación *in vivo* e *in vitro*

Para analizar la transmisión del transgén se cruzaron machos Tg YeGFP con hembras WT por monta natural y por fecundación *in vitro*. Tras el análisis de la expresión de eGFP y de las PCRs de sexado de embriones obtenidos se pudo determinar el porcentaje de blastocistos machos y hembras que se obtuvieron *in vivo* e *in vitro*.

Tal y como se observa en la **Figura 17**, en el caso de monta natural se puede observar una transmisión estable del transgén eGFP en la línea germinal masculina sin afectar la proporción de sexos 51,5% de machos y 48,5% de hembras (n=5 machos, > 200 embriones). Sin embargo, en el caso de FIV, existe una alteración en la proporción de sexos en la descendencia ya que el 94 % de los embriones eran hembras (n=5 machos, >200 embriones).

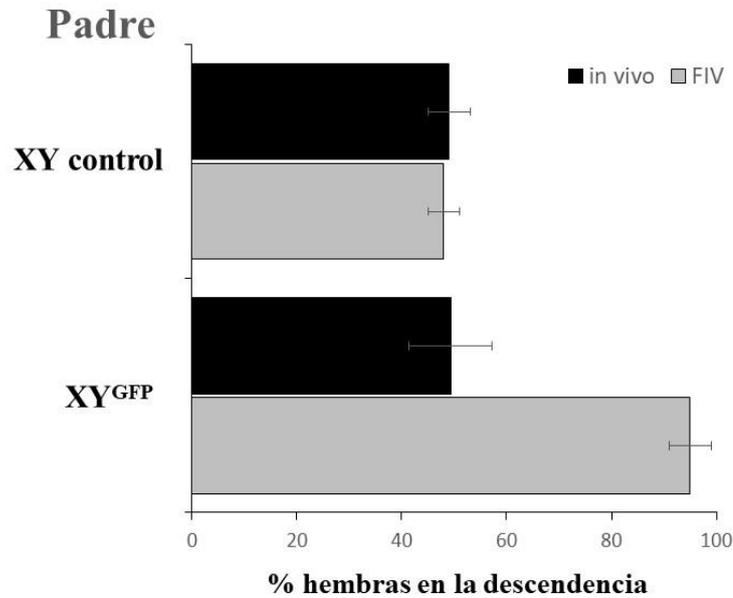


Figura 17. Resultados del porcentaje de hembras en la descendencia procedente de cruces de machos YeGFP con hembras WT *in vivo* e *in vitro* sexados mediante PCR de blastocistos.

Además, también se observó una transmisión estable del transgén en la descendencia procedente de partos por monta natural (n= 200 crías de diferentes hembras) sexadas *de visu* y por PCR tras su nacimiento. Al cruzar machos YeGFP con hembras WT, se encuentra una transmisión estable de eGFP en la línea germinal masculina sin afectar la proporción de sexos (51,5% de machos).

4.4.1 Análisis de la motilidad espermática

Para analizar si la diferencia observada *in vitro* en la proporción de sexo de los blastocistos se debía a diferencias en motilidad entre spz portadores del transgén en el chr-Y, analizamos la motilidad y las subpoblaciones espermáticas de los Tg y lo comparamos con WT.

Las variables cinemáticas correspondientes a toda la población espermática se describen en la **Tabla 2**. Las variables cinemáticas que indicaron mayor variabilidad fueron VSL y BCF, con coeficientes de variación de 65,4% y 55,01%, respectivamente.

Tabla 2. Variables cinemáticas de spz de machos YeGFP y control (n=5 machos por grupo).

	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	LIN	STR	WOB
YEGFP (n=1042)								
Min.	10,61 ± 2,81	0 ± 1,53	7,09 ± 1,6	0,49 ± 0,06	0 ± 0,18	0 ± 0,01	0 ± 0,01	0,07 ± 0,0
1st Qu.	120,14	31,22	54,03	3,58	6,25	0,24	0,59	0,41
Median	182,96	80,18	99,39	5,04	10,00	0,39	0,79	0,50
Mean	192,00	75,36	95,57	4,96	10,67	0,38	0,71	0,49
3rd Qu.	264,28	112,17	133,69	6,28	14,71	0,50	0,92	0,58
Max.	538,36	241,87	254,22	13,30	32,56	0,99	1,00	0,98
SD	90,76	49,31	51,55	1,87	5,87	0,20	0,26	0,16
CONTROL (n=1185)								
Min.	12,66 ± 2,15	0 ± 1,35	7,22 ± 1,33	0,68 ± 0,05	0 ± 0,18	0 ± 0,01	0 ± 0,01	0,11 ± 0,0
1st Qu.	187,69	72,44	99,15	4,24	8,00	0,33	0,69	0,46
Median	236,34	103,60	127,66	5,55	12,50	0,43	0,82	0,53
Mean	226,72	98,98	121,23	5,43	12,78	0,43	0,77	0,53
3rd Qu.	279,19	128,47	150,56	6,63	17,00	0,53	0,93	0,60
Max.	405,65	240,72	253,25	13,58	34,62	1,00	1,00	0,98
SD	73,84	46,56	45,94	1,77	6,32	0,18	0,21	0,14

Los resultados del análisis de componentes principales permitieron dividir las variables cinemáticas en tres componentes principales (PC) que explican un 90,2% de la varianza (**Tabla 3**): Progresividad y velocidad lineal (PC1) representada por LIN, STR, WOB y VSL con gran efecto de LIN; Velocidad curvilínea, desplazamiento lateral de la cabeza y velocidad media (PC2) representada por VSL, VCL, VAP y ALH, con un mayor efecto de ALH. Finalmente, PC3, representado por BCF, denominado frecuencia del desplazamiento de la cabeza con una varianza total del 18 % explicada. Estos resultados indicaron que la velocidad de los spz tiene un efecto relativamente mayor (39,7%) sobre la varianza total que las otras variables.

Tabla 3. Resultados del análisis de componentes principales (PC) para los parámetros cinemáticos analizados en los spz de YeGFP.

Componente principal	PC1	PC2	PC3
LIN	0,985		
STR	0,866		
WOB	0,846		
VCL		0,91	
VSL	0,702	0,562	
VAP		0,703	
ALH		0,946	
BCF			0,937
Varianza explicada (%)	39,7	32,5	18

Los datos del análisis por conglomerados revelaron cuatro subpoblaciones (*clusters*) (**Tabla 4**). Los valores cinemáticos correspondientes a cada subpoblación se caracterizaron como: grupo 1 (*cluster 1*) que incluye los spz rápidos progresivos (RP) que muestran el VSL, LIN y STR más alto (**Fig. 18**), y comprendieron el 17,27% de las células totales. El grupo 2 (*cluster 2*), que contiene los spz medios progresivos (MP), que mostraron baja velocidad y alta progresividad (VCL baja y LIN alta) (**Fig. 18**). El grupo 3 (*cluster 3*), que incluye los rápidos no progresivos (RNP), que son los spz hiperactivados que tienen una VCL y ALH altas (**Fig. 18**). El grupo 4 (*cluster 4*), que incluye lentos no progresivos (LNP) que se caracterizan por la menor velocidad y progresividad con una VSL y LIN muy bajas (**Fig. 18**). Este grupo representa un 25,04% de los spz del eyaculado, bastante alto comparado con el control, que tan solo contiene un 11,3% de este tipo de spz.

Tabla 4. Resultados del análisis multivariado de conglomerados de k-medias para clasificar los spz en un número reducido de subpoblaciones (*clusters*) según sus variables cinemáticas.

	n	Control	YeGFP
<i>Cluster 1</i> (RP)	590	410 (34,59%)	180 (17,27%)*
<i>Cluster 2</i> (MP)	482	183 (15,44%)	299 (28,69%)*
<i>Cluster 3</i> (RNP)	760	458 (38,65%)	302 (28,98%)*
<i>Cluster 4</i> (LNP)	395	134 (11,3%)	261 (25,04%)*

RP: rápidos progresivos; MP: medios progresivos; RNP: rápidos no progresivos; LNP: lentos no progresivos. *Indica diferencias significativas entre columnas, test-t, $p < 0,05$.

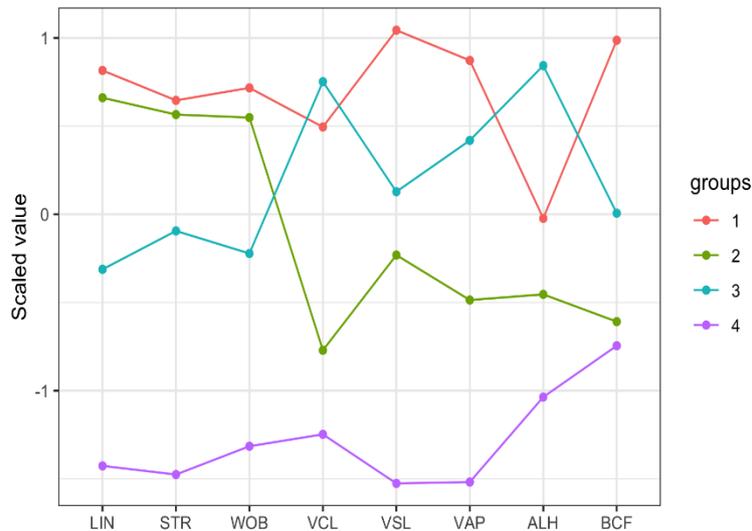


Figura 18. Variables cinemáticas de los spz YeGFP agrupados en *clusters*.

En la población de spz YeGFP se observa una reducción de los spz RP y RNP, en comparación con el control. Las subpoblaciones pertenecientes al grupo LNP mostraron mayor proporción en YeGFP que en el control (**Fig. 19**).

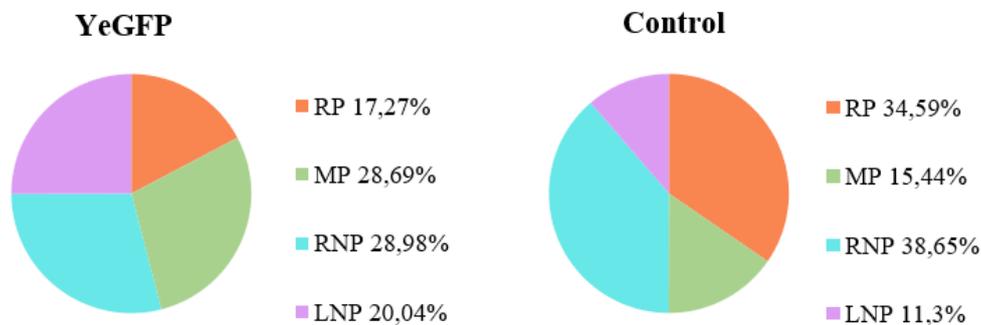


Figura 19. Porcentajes de spz YeGFP pertenecientes a cada *cluster*.

Usando el análisis CASA de la cinética de motilidad y el análisis de conglomerados de k-medias, encontramos diferentes subpoblaciones de spz entre YeGFP y WT (n=5 por grupo), lo que sugiere que la motilidad diferencial o la cinética de capacitación podrían ser la razón de la alteración de la proporción de sexos producido por la FIV, y que *in vivo*, debido a que los spz nadan en grupos dinámicos, los spz con o sin eGFP pueden formar parte de estos grupos, enmascarando las diferencias evidenciadas en la FIV.

5. DISCUSIÓN

Debido a la dificultad de introducir un transgén en el chr-Y, se desconoce si un transgén presente en dicho chr-Y se expresa y se transmite de forma similar a otras secuencias Tgs integradas en otro chr. En este trabajo se ha utilizado un modelo de ratón YeGFP, en el que se insertó el gen eGFP entre los genes *Ddx3y* y *Uty* (cuyos parálogos en el chr-X son el gen *Ddx3x* y *Utx*), para analizar cómo se expresa el transgén en el adulto, si la expresión es constante durante el desarrollo fetal, si los niveles de expresión están determinados por la metilación, así como para determinar cómo se trasmite *in vivo* e *in vitro*.

Desde hace años se ha pensado que los genes ligados al chr-X se expresaban de manera similar en machos y hembras debido al silenciamiento génico que provoca la condensación de uno de los dos chrs X en hembras. Sin embargo, algunos de estos genes, que tienen parálogos en el chr-Y, escapan a la inactivación y se expresan más en las hembras. Tanto *Ddx3x* como *Utx* permanecen activos en los dos chr-X de las hembras y para que en los machos se pueda compensar la segunda copia expresada de la hembra, el gen ligado a Y debe tener la misma función y expresarse en tejidos similares (Xu *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito en el modelo de ratón que las hembra KO con delección homocigota de *Utx* no sobreviven, pero los machos hemicigotos son viables, lo que se atribuye a la presencia del gen *Uty*, que tiene papel funcional similar (Gažová *et al.*, 2019). También se ha demostrado en células de mamífero que *Ddx3y* es funcionalmente intercambiable con *Ddx3x* (Deschepper, 2020).

Sin embargo, el análisis de la expresión del transgén en los diferentes órganos del adulto YeGFP ha revelado que existen diferencias en la expresión de eGFP. La fluorescencia muestra distinta intensidad en diferentes órganos del animal, siendo incluso inexistente en algunos tejidos, es decir, existe una variación en la expresión del transgén a nivel de tejidos. Por el contrario, en el modelo de ratón Tg XeGFP, que porta el transgén en el chr-X, los ratones son completamente verdes a excepción del pelaje y eritrocitos (Okabe *et al.*, 1997). Estas diferencias pueden deberse a que en estos tejidos no se expresa el chr-Y, o al menos no se expresan los genes entre los que se ha integrado el transgén (el transgén está integrado a 14 Kb de *Uty* y a 2 Kb de *Ddx3y*). Se ha notificado que, en algunos tejidos no reproductivos, como puede ser en aquellos donde no se expresa eGFP

o donde la expresión es muy baja como bazo, pulmón o riñón, los genes del segmento diferencial MSY del chr-Y tienen una regulación diferente que en tejidos reproductivos. Por ejemplo, la expresión de *Uty* es distinta a la de *Utx* en cerebro e hígado adulto, lo que implica que los dos parálogos pueden ser regulados diferencialmente en algunos tejidos (Xu *et al.*, 2008). De hecho, Deschepper (2020) observó que la producción de la proteína *Ddx3y* estaba, en contraste con la expresión ubicua del gen, restringida a la línea germinal masculina, por lo que estas regiones del chr-Y pueden funcionar como una unidad reguladora íntegra, y puede involucrar mecanismos distintos a la mera regulación transcripcional de los genes codificadores de proteínas autosómicos. Nuestros resultados indican que aunque el promotor CAG de la construcción es de alta expresión ubicua, en este transgén es la región donde se ha integrado del chr-Y la que determina los tejidos donde se expresa.

Además, sorprendentemente, la fluorescencia de estos machos en la piel es tipo mosaico, similar a la observada en las hembras que portan una copia en hemicigosis de un transgén eGFP ligado al X (debido a la inactivación de un chr-X), y muestran herencia clonal del estado activo o inactivo a través de la división celular. La expresión en mosaico del transgén de la piel del YeGFP indica que la elección por parte de la célula de que su chr-Y permanezca activo o inactivo se mantiene estable y se hereda clonalmente en la división celular. El mosaicismo se produce porque durante el desarrollo embrionario, el linaje de melanocitos que recubre la piel se origina a partir de células troncales que desde la parte dorsal se dividen por los lados hacia la parte ventral; de forma que todas las células que se originan de la célula madre heredan el grado de expresión de la célula progenitora. Es posible que exista una regulación entre la expresión de los genes parálogos del chr-X y chr-Y, de forma que, en una célula y en los clones derivados de esa célula solo se exprese la copia de un determinado chr, similar a la expresión monoalélica (da Rocha y Gendrel, 2019). La expresión monoalélica ocurre cuando solo uno de los dos alelos de un gen está activo. Hay tres clases de genes que muestran expresión monoalélica en genomas de mamíferos: (1) genes imprinting que se expresan monoalélicamente de manera dependiente del padre de origen; (2) genes ligados al chr-X que experimentan inactivación aleatoria del chr-X en células femeninas; (3) expresión monoalélica de genes ubicados en autosomas. La transmisión de los patrones de expresión monoalélica durante la división celular implica que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la memoria celular de estos estados de expresión (da Rocha y Gendrel, 2019).

En este trabajo se ha observado la existencia de 3 fenotipos diferentes de ratones Tgs en función de la expresión de eGFP. Unos que no presentaban fluorescencia, otros que sí lo hacían, pero con intensidad media y otros que eran verdes muy intensos. Tras analizar la descendencia de la siguiente generación, se observó que los ratones no verdes y verdes muy intenso transmitían preferencialmente su fenotipo. Sin embargo, los ratones de intensidad media tenían descendencia de los tres fenotipos con proporciones similares. Los resultados sugieren que estas diferencias de expresión están relacionadas con los niveles de metilación de una isla CpG presente en la construcción transgénica que se ha integrado en el chr-Y, de manera que la metilación muestra una correlación inversa con la expresión.

Para determinar en qué momento del desarrollo se establecía el fenotipo del individuo, se analizó la fluorescencia en el estadio de blastocisto, en fetos justo después de la gastrulación, y en fetos durante la organogénesis. Las marcas de metilación específicas del ADN del alelo parental se borran en el linaje de la línea germinal para posteriormente restablecerse durante la gametogénesis de acuerdo con el sexo del individuo, y en el ratón, se ha descrito que esto ocurre a partir del día 8 de desarrollo embrionario (da Rocha y Gendrel, 2019). Estos patrones de metilación son uno de los mecanismos por los que se establecen las marcas epigenéticas. Existen algunos alelos, los epialelos, cuyas marcas epigenéticas se transmiten en cada generación y son iguales en la secuencia de bases a los alelos de los genes originales, pero se diferencian en el marcaje epigenético, lo que provoca que se manifiesten de manera distinta, generando variantes de los genes que no dependen de la secuencia de bases, sino de las marcas epigenéticas. Por tanto, a pesar de existir tres fenotipos, independientemente del fenotipo parental, en estadio de blastocisto todos los embriones eran verdes y es justo después de la gastrulación cuando adquieren el patrón de metilación que luego mantienen y expresan durante el resto del desarrollo embrionario y en el adulto.

Los resultados sugieren que existen tres niveles de regulación de la expresión del transgén eGFP. Por una parte, a nivel de tejido, la región donde se ha integrado determina los tejidos donde se expresa eGFP en el adulto. En segundo lugar, a nivel de individuo, existe una regulación del nivel de expresión del transgén en función de la metilación de al menos una isla CpG presente en el mismo, que determina que la expresión sea alta, media, o nula. En tercer lugar, a nivel celular, existe una expresión monoalélica clonal que determina que una célula exprese o no el transgén, mecanismo posiblemente mediado

por la localización del transgén entre dos genes *Ddx3y* y *Uty* los cuales tienen homólogos en el chr-X, por lo que la expresión pudiera estar regulada de tal forma que solo una de las dos copias se expresara. Sería importante analizar si existe compensación en la expresión de *Ddx3x/Ddx3y* y *Utx/Uty* en células verdes y no verdes de los machos Tgs YeGFP.

En relación con la transmisión del transgén se ha observado que al cruzar machos YeGFP con hembras WT por monta natural, se produce una transmisión estable de eGFP en la línea germinal masculina sin afectar la proporción de sexos. Sin embargo, al realizar FIV, el 94 % de los blastocistos generados eran hembras. El mismo efecto se observó en ratones Tgs XeGFP (Tg-CAG-EGFP, RBRC00980) pero en sentido inverso (datos aportados por el laboratorio), es decir, mediante FIV pero no *in vivo*, el 95% de los embriones producidos fueron machos, lo que confirma que los portadores de esperma Y- o X-eGFP son menos capaces de fecundar *in vitro*. Usando el análisis CASA de la cinética de motilidad y el análisis de conglomerados de k-medias, se ha observado una disminución de las subpoblaciones de spz rápidos progresivos y rápidos no progresivos de los machos YeGFP, y un aumento de la subpoblación de spz medios progresivos y lentos no progresivos. Esta diferencia de poblaciones podría ser debida a que los spz portadores del transgén sean los que tienen su motilidad alterada.

Sin embargo, los spz portadores del transgén consiguen fecundar *in vivo* con la misma frecuencia que los spz sin transgén. La explicación por lo que los spz YeGFP sí fecundan *in vivo*, puede deberse a que el tracto femenino podría regular la migración de los spz y no diferenciar entre spz portadores o no del transgén. Tung *et al.*, (2017) notificaron que los spz de bovino forman grupos cooperativos cuando se los coloca en medios viscosos viscoelásticos, similares a las secreciones uterinas y el moco cervical. Esta cooperación entre spz se ha observado en ratones y varias especies de roedores (Immier *et al.*, 2007; Pizzari y Foster, 2008), observando que los spz unidos nadan más rápido que los que se mueven individualmente. Las propiedades viscoelásticas de los fluidos biológicos promueven la interacción espermatozoide-espermatozoide que conduce a un patrón sorprendente de natación colectiva que puede facilitar la migración de los spz y contribuir a una fertilización exitosa (Tung *et al.*, 2017).

Los resultados sugieren que en los Tgs YeGFP la motilidad diferencial entre spz, portando o no el transgén podrían ser la razón de la alteración de la proporción de sexos producida por la FIV, y que *in vivo*, debido a que los spz nadan en grupos dinámicos, los

spz con o sin eGFP forman parte de esos grupos, enmascarando las diferencias evidenciadas en la FIV.

6. CONCLUSIONES

- A nivel de tejido, el lugar de integración del transgén eGFP entre los genes *Ddx3y* y *Uty* del chr-Y determina los tejidos específicos donde se expresa.
- A nivel de individuo, el transgén se comporta como un epialelo metaestable. Existe una regulación de la expresión del transgén eGFP relacionada con la metilación de una región CpG que se adquiere en la etapa peri-implantacional, y se modula posteriormente en la etapa fetal de organogénesis.
- A nivel celular, la expresión clonal y al azar del transgén eGFP en la piel de los Tgs recién nacidos produce un mosaicismo similar al producido en las hembras por inactivación de uno de los chr-X, sugiriendo un nuevo mecanismo de expresión monoalélica en el chr-Y.
- Las diferencias de motilidad de los spz portadores del transgén reducen su capacidad de fecundar *in vitro* pero no *in vivo*, probablemente por la cooperación espermática que se produce *in vivo*.

7. AGRADECIMIENTOS

No podía acabar este trabajo sin agradecer a todas las personas que de una u otra forma me han ayudado a llegar hasta aquí.

Quiero agradecer a todo el personal del departamento de Reproducción Animal del INIA por haberme acogido como una más en el equipo desde el primer momento. Ha sido un placer rodearme de unas científicas maravillosas de las que tanto he aprendido. En especial a Alfonso y Eva, que me habéis guiado y apoyado durante la redacción de este trabajo.

También quiero dar las gracias a mi familia, que ha dedicado todo su tiempo, todo su esfuerzo y todos sus recursos con tal de educarme y formarme lo mejor posible para afrontar la vida. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

Por otro lado, tengo que agradecer enormemente a todas las personas que han estado a mi lado durante este año; mis amigas que valen oro, mis compis de piso y todas las personas estupendas que he tenido la suerte de conocer este año en Madrid. A todos vosotros, gracias por aguantarme en los buenos y no tan buenos momentos.

Por último, pero la más importante, Sara, no hay palabras suficientes para agradecerte todo lo que has hecho por mi este año. Eres la mejor. Gracias por haberme acompañado en esta experiencia y recuerda siempre que “Tú eres yo y yo soy tú”.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bellott, D. W., Hughes, J. F., Skaletsky, H., Brown, L. G., Pyntikova, T., Cho, T. J., Koutseva, N., Zaghul, S., Graves, T., Rock, S., Kremitzki, C., Fulton, R. S., Dugan, S., Ding, Y., Morton, D., Khan, Z., Lewis, L., Buhay, C., Wang, Q., Watt, J., ... Page, D. C. (2014). Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature*, *508*(7497), 494–499. <https://doi.org/10.1038/nature13206>
- Bourc'his D. (2021). Metastable epialleles are stable in their instability. *Nature genetics*, *53*(8), 1121–1123. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00907-x>
- Brockdorff N. (2019). Localized accumulation of Xist RNA in X chromosome inactivation. *Open biology*, *9*(12), 190213. <https://doi.org/10.1098/rsob.190213>
- Capel B. (2017). Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature reviews. Genetics*, *18*(11), 675–689. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., y Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, *173*(1 Spec No), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
- Deschepper, C.F. (2020). Regulatory effects of the *Uty/Ddx3y* locus on neighboring chromosome Y genes and autosomal mRNA transcripts in adult mouse non-reproductive cells. *Sci Rep* *10*, 14900. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71447-3>
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C., ... Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(30), 10604–10609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>

- Gažová, I., Lengeling, A., y Summers, K. M. (2019). Lysine demethylases KDM6A and UTY: The X and Y of histone demethylation. *Molecular genetics and metabolism*, 127(1), 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.04.012>
- Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., y Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life sciences*, 232, 116636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>
- Hirata, W., Tomoda, T., Yuri, S., y Isotani, A. (2022). Generation of the Y-chromosome linked red fluorescent protein transgenic mouse model and sexing at the preimplantation stage. *Experimental animals*, 71(1), 82–89. <https://doi.org/10.1538/expanim.21-0119>
- Imaimatsu, K., Fujii, W., Hiramatsu, R., Miura, K., Kurohmaru, M., y Kanai, Y. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knock-in of the murine Y chromosomal Sry gene. *The Journal of reproduction and development*, 64(3), 283–287. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-161>
- Immler, S., Moore, H. D., Breed, W. G., y Birkhead, T. R. (2007). By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PloS one*, 2(1), e170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000170>
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Jaenisch, R., y Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, 33 Suppl, 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jonkers, I., Monkhorst, K., Rentmeester, E., Grootegoed, J. A., Grosveld, F., y Gribnau, J. (2008). Xist RNA is confined to the nuclear territory of the silenced X chromosome throughout the cell cycle. *Molecular and cellular biology*, 28(18), 5583–5594. <https://doi.org/10.1128/MCB.02269-07>

- Kato, T., Miyata, K., Sonobe, M., Yamashita, S., Tamano, M., Miura, K., Kanai, Y., Miyamoto, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Inui, M., Kikusui, T., Asahara, H., y Takada, S. (2013). Production of Sry knockout mouse using TALEN via oocyte injection. *Scientific reports*, 3, 3136. <https://doi.org/10.1038/srep03136>
- Loda, A., y Heard, E. (2019). Xist RNA in action: Past, present, and future. *PLoS genetics*, 15(9), e1008333. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008333>
- Marco-Jiménez, F. y Vicente Antón, J. S. (2012). Fundamentos y técnicas de la reproducción. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/72469>
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Matsubara, Y., Kato, T., Kashimada, K., Tanaka, H., Zhi, Z., Ichinose, S., Mizutani, S., Morio, T., Chiba, T., Ito, Y., Saga, Y., Takada, S., y Asahara, H. (2015). TALEN-Mediated Gene Disruption on Y Chromosome Reveals Critical Role of EIF2S3Y in Mouse Spermatogenesis. *Stem cells and development*, 24(10), 1164–1170. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0466>
- Mojica, F. J., Juez, G., y Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*, 9(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>
- Nakanishi, T., Kuroiwa, A., Yamada, S., Isotani, A., Yamashita, A., Tairaka, A., Hayashi, T., Takagi, T., Ikawa, M., Matsuda, Y., y Okabe, M. (2002). FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome. *Genomics*, 80(6), 564–574. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.7008>

- Nakasuji, T., Ogonuki, N., Chiba, T., Kato, T., Shiozawa, K., Yamatoya, K., Tanaka, H., Kondo, T., Miyado, K., Miyasaka, N., Kubota, T., Ogura, A., y Asahara, H. (2017). Complementary Critical Functions of Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. *PLoS genetics*, *13*(1), e1006578. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006578>
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., y Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters*, *407*(3), 313–319. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00313-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00313-x)
- Penny, G. D., Kay, G. F., Sheardown, S. A., Rastan, S., y Brockdorff, N. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, *379*(6561), 131–137. <https://doi.org/10.1038/379131a0>
- Pizzari, T., y Foster, K. R. (2008). Sperm sociality: cooperation, altruism, and spite. *PLoS biology*, *6*(5), e130. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060130>
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., y Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, *111*(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-h)
- Quinn, P., Warnes, G. M., Kerin, J. F., y Kirby, C. (1985). Culture factors affecting the success rate of in vitro fertilization and embryo transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *442*, 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb37520.x>
- Rakyan, V. K., Blewitt, M. E., Druker, R., Preis, J. I., y Whitelaw, E. (2002). Metastable epialleles in mammals. *Trends in genetics: TIG*, *18*(7), 348–351. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(02\)02709-9](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(02)02709-9)
- Rakyan, V. K., Hildmann, T., Novik, K. L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A. V., Andrews, T. D., Howe, K. L., Otto, T., Olek, A., Fischer, J., Gut, I. G., Berlin, K., y Beck, S. (2004). DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS biology*, *2*(12), e405. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020405>

- Reik, W., Dean, W., y Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* (New York, N.Y.), 293(5532), 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1063443>
- da Rocha, S. T., y Gendrel, A. V. (2019). The influence of DNA methylation on monoallelic expression. *Essays in biochemistry*, 63(6), 663–676. <https://doi.org/10.1042/EBC20190034>
- Sahakyan, A., Yang, Y., y Plath, K. (2018). The Role of Xist in X-Chromosome Dosage Compensation. *Trends in cell biology*, 28(12), 999–1013. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.005>
- Sierra, I., Y Anguera, M. C. (2019). Enjoy the silence: X-chromosome inactivation diversity in somatic cells. *Current opinion in genetics & development*, 55, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.012>
- Soh, Y. Q., Alföldi, J., Pyntikova, T., Brown, L. G., Graves, T., Minx, P. J., Fulton, R. S., Kremitzki, C., Koutseva, N., Mueller, J. L., Rozen, S., Hughes, J. F., Owens, E., Womack, J. E., Murphy, W. J., Cao, Q., de Jong, P., Warren, W. C., Wilson, R. K., Skaletsky, H., ... Page, D. C. (2014). Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes. *Cell*, 159(4), 800–813. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.052>
- Tojo, H., Fukumaki, Y., y Ogita, Z. (1988). Transgenic mouse carrying a foreign gene on its Y-chromosome. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, 37(3), 347–350. https://doi.org/10.1538/expanim1978.37.3_347
- Tung, C. K., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A. G., Ardon, F., Wu, M., y Suarez, S. S. (2017). Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Scientific reports*, 7(1), 3152. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03341-4>
- Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., Camacho, M., Barquero, V., Soler, C., y Roldan, E. (2021). Sperm kinematic subpopulations of the American crocodile (*Crocodylus acutus*). *PloS one*, 16(3), e0248270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248270>

- Waterland, R. A., Dolinoy, D. C., Lin, J. R., Smith, C. A., Shi, X., y Tahiliani, K. G. (2006). Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 44(9), 401–406. <https://doi.org/10.1002/dvg.20230>
- Whitelaw, E., Sutherland, H., Kearns, M., Morgan, H., Weaving, L., y Garrick, D. (2001). Epigenetic effects on transgene expression. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 158, 351–368. <https://doi.org/10.1385/1-59259-220-1:351>
- Xu, J., Deng, X., Watkins, R., y Disteché, C. M. (2008). Sex-specific differences in expression of histone demethylases Utx and Uty in mouse brain and neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(17), 4521–4527. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5382-07.2008>
- Yamamoto, S., Nagao, Y., Kuroiwa, K., Hakamata, Y., Ichida, M., Saito-Ohara, F., Tominaga, K., y Endo, H. (2014). Rapid selection of XO embryonic stem cells using Y chromosome-linked GFP transgenic mice. *Transgenic research*, 23(5), 757–765. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9813-0>
- Yano, Y., Chiba, T., y Asahara, H. (2020). Analysis of the Mouse Y Chromosome by Single-Molecule Sequencing With Y Chromosome Enrichment. *Frontiers in genetics*, 11, 406. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00406>
- Zhang, Y. E., Vibranovski, M. D., Landback, P., Marais, G. A., y Long, M. (2010). Chromosomal redistribution of male-biased genes in mammalian evolution with two bursts of gene gain on the X chromosome. *PLoS biology*, 8(10), e1000494. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000494>
- Zhao, X., Wei, W., Pan, H., Nie, J., Chen, D., Zhang, P., Chen, F., Fu, Q., Zuo, E., Lu, Y., y Zhang, M. (2019). Identification of the Sex of Pre-implantation Mouse Embryos Using a Marked Y Chromosome and CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, 9(1), 14315. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50731-x>

- Zhou, Y., Zhang, T., Zhang, Q. K., Jiang, Y., Xu, D. G., Zhang, M., Shen, W., y Pan, Q. J. (2014). Unstable expression of transgene is associated with the methylation of CAG promoter in the offspring from the same litter of homozygous transgenic mice. *Molecular biology reports*, *41*(8), 5177–5186. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3385-1>
- Zuo, E., Cai, Y. J., Li, K., Wei, Y., Wang, B. A., Sun, Y., Liu, Z., Liu, J., Hu, X., Wei, W., Huo, X., Shi, L., Tang, C., Liang, D., Wang, Y., Nie, Y. H., Zhang, C. C., Yao, X., Wang, X., Zhou, C., ... Yang, H. (2017). One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell research*, *27*(7), 933–945. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.81>