



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

***IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS PENETRANTES (APTÁMEROS) DE
OVOCITOS DE CERDO***

QUE PRESENTA:

Biól. María Magaña Méndez

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Director de tesis:

Dr. Marcos Cajero Juárez

IIAF-CMEB-UMSNH

Morelia, Mich., Agosto, 2020

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección del Dr. Marcos Cajero Juárez.

Agradecemos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por las facilidades para la realización del presente trabajo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por la CIC-UMSNH, además, agradecemos el apoyo que consistió en la Beca Nacional CONACYT 2018-2020 (No. de becario 708741).

Agradecemos también las facilidades al rastro Municipal de Morelia y el rastro de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Morelia Michoacán por las facilidades para la obtención de muestras biológicas.

De manera especial agradezco a los doctores que me guiaron durante todo el proceso, mi asesor el Dr. Marcos Cajero Juárez, mis sinodales Dra. Rosa Elvira Núñez Anita, Dr. Alejandro Bravo Patiño, Dra. Ma. Virginia Segura García y Dr. Javier Oviedo Boyso de la misma manera a los Doctores que me brindaron su apoyo y conocimiento, Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre y Dr. Juan José Valdez Alarcón.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres porque sin importar el esfuerzo, dedicaron parte de su vida para educarme, brindarme los valores y la motivación necesaria para llegar hasta este momento, a mis hermanos por su apoyo y comprensión y principalmente a mis abuelos por alentarme a seguir siempre adelante.

A mi novio Sergio Daniel por estar conmigo siempre brindarme su cariño, apoyo, motivación e inspiración a cada momento, para la realización de la tesis y muchas otras cosas.

A mis amigos y compañeros con los cuales nos apoyamos mutuamente durante toda nuestra formación profesional y que actualmente lo seguimos haciendo y también a aquellos que aunque elegimos caminos diferentes aún seguimos animándonos.

CONTENIDO

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Transferencia de información genética	3
1.1.1. Natural	3
1.1.2. Artificial	4
2. ANTECEDENTES GENERALES	5
2.1. Manipulación del genoma animal y celular	5
2.2. Característica de los Péptidos penetrantes celulares	6
2.2.1. Clasificación de los CPP	7
2.2.2. Métodos para unir moléculas carga a los CPP	8
2.2.3. Mecanismos de internalización celular de los CPP	9
2.2.4. Aplicaciones de los CPP	12
2.2.5. Toxicidad de CPP	13
3. ANTECEDENTES PARTICULARES	13
3.1. Aplicación de CPP en células germinales	13
3.2. Técnica de presentación molecular en fagos (Phage Display)	15
3.3. El cerdo como modelo de investigación	18
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVO GENERAL	20
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
8. MATERIALES Y MÉTODOS	21
8.1. Amplificación y titulación de la biblioteca viral (PhD-Phage Display)	21
8.2. Obtención de los ovocitos de cerdo	22
8.3. Biopanning <i>in vitro</i> en ovocitos	22
8.4. Inmunocitoquímica celular	24
8.5. Inmunofluorescencia celular	24
8.6. Extracción de ADN viral	25
8.7. Análisis estadístico	25
9. RESULTADOS	26

9.1. Amplificación y titulación de la biblioteca viral	26
9.2. Obtención y manejo de los ovocitos de cerdo	26
9.3. Biopanning <i>in vitro</i> en ovocitos	29
9.4. Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia celular	30
9.5. Extracción de ADN viral	34
10. DISCUSIÓN	35
11. CONCLUSIÓN	40
12. PERSPECTIVAS	40
13. ANEXOS	41
14. REFERENCIAS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de cargas que se pueden unir a lo CPP _____	7
Figura 2. Enlace covalente y no covalente para unir CPP con su carga _____	9
Figura 3. Mecanismos de internalización celular de los CPP _____	11
Figura 4. Estructura del fago M13 y sus dos sitios posible para la fusión genética con diversos péptidos _____	17
Figura 5. Genoma del Bacteriófago M13 _____	18
Figura 6. Biopanning en ovocitos de cerdo _____	23
Figura 7. Ovocitos en sus diferentes estados _____	26
Figura 8. Porcentaje de ovocitos libres de la zona de la granulosa _____	27
Figura 9. Porcentaje de ovocitos libres de la membrana pelúcida _____	28
Figura 10. Proceso de degradación de las membranas que recubren al ovocito _____	29
Figura 11. Plaqueo de la tercer ronda de selección con IPTG y X-GAL. _____	30
Figura 12. Detección viral (dot blot) en papel de nitrocelulosa _____	31
Figura 13. Inmunohistoquímica celular de ovocitos _____	32
Figura 14. Inmunofluorescencia de ovocitos de cerdo _____	33
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa _____	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de experimentos y rodas de selección realizadas _____	29
--	----

ABREVIATURAS

°

°C

Grados celsious o centígrados, 21, 23, 24, 25, 28

A

ADN

Ácido desoxirribonucleico, 5, 13, 14, 15, 25, 34

ANOVA

Análisis de varianza, 25

AP

fosfatasa alcalina, 31
fosfatasa alcalina, 30, 31

ARNip

ARN pequeño de interferencia, 12

C

CPP

siglas en ingles de péptido penetrante celular, 2,4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 32, 35, 37, 38, 39

E

EGFP

proteína verde fluorescente mejorada, 14

F

FITC, 31

Isotiocianato de fluoresceína, 1, 2, 21, 25, 33, 37

FIV

Fertilización in vitro, 14

G

GFP

siglas en ingles de proteína verde fluorescente, 19

H

h

Hora / Horas, 14, 21, 22, 23, 24

HP

Fosfatasa alcalina, 24

HPV

Virus del papiloma humano, 14

I

IgG

Inmunoglobulina G, 21, 31

iPS

Células Madre pluripotentes, 12, 13

IPTG

Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, 23

L

LB

Luria Bertani, 21

M

MAP

Proteína anfipática creada de novo a partir de residuos de lisina, arginina y leucina, 8

MI

Microinyección, 5

min

Minutos, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31

MP

Membrana plasmática, 6, 34

MPG

Proteína obtenida por fusión de la glucoproteína transmembrana del VIH, gp41, con el antígeno T del virus SV40., 8

N

Neg

Negativo, 31

P

PA

Partenogénica, 14

PBS

Fosfato salino o buffer fosfato salino, 22, 24

PEG

Polietilenglicol, 25

pfu

Unidades formadoras de placas, 21

pH

Potencial de Hidrógeno. Medida para determinar el grado de alcalinidad o acidez de una disolución., 2, 28, 36

pos

Positiva, 30

Pos

Positivo, 31

R

rpm

Revoluciones por minuto, 21, 22, 23, 25

S

SCNT

Tranferencia nuclear de células somáticas, 5

SFB

Suero fetal bovino, 24

SG3

Peptido penetrante celular hidrofóbico, 8

SMGT

Transferencia de genes mediada por espermatozoides, 5

T

T.A

Temperatura ambiente, 21

Tat

transactivador de la transcripción génica del virus de la inmunodeficiencia humana, 8, 14

Tet

Tetraciclina, 21

X

X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido o también BCIG, 23

Z

ZP

Zona pelúcida, 28

M

μ l

Microlitros, 21, 22, 24, 25

ABSTRACT

Cellular penetrating peptides (CPPs) belong to a new class of delivery vectors for different molecules. They are classified by their physicochemical properties into cationic, hydrophobic and amphipathic. According to their origin they can be natural, chimeric or synthetic. CPPs can bind different molecules (charges), such as imaging agents, drugs, proteins, DNA, and RNA. Some proposed mechanisms for cellular uptake of CPP are direct translocation, endocytosis, and translocation through the formation of a membrane structure. This depends on factors such as the method of binding the charge to the CPPs, temperature and pH. In the present work, CPPs that were found in the viral library Ph.D.-Phage Display, which have 10^9 combinations of 12 amino acid peptides, were isolated. The objective was to identify and isolate peptides capable of translocating to the pig oocyte cell membrane. Five experiments were performed independently, plus three rounds of selection (biopanning) for each. Pig oocytes without membranes such as the granulosa layer and the pellucid zone were used. Each round of selection, to isolate the CPPs, consisted of incubating the viral library with the oocytes (15-20 in each selection), then the virus was eliminated in a first step by cell washes and finally by treatment of the oocytes with trypsin. The cell lysate was amplified in *E. coli* 2738 K12 and a viral plaque was performed to verify the existence of bacteriophages. From this experiment, the second round of selection was carried out and finally, from the second round of selection, the third round was carried out. A total of 14 viral clones were obtained, of which 4 clones tested positive for cellular immunofluorescence in which the primary rabbit-antiM13 and secondary mouse anti-rabbit IgG-FITC antibodies were used.

In summary, 4 CPPs of 12 amino acids in length were identified, able to translocate into the pig oocyte.

Key words: Phage Display, Peptide Aptamer, Translocation

RESUMEN

Los péptidos penetrantes celulares (CPP) pertenecen a una nueva clase de vectores de administración de diferentes moléculas. Se clasifican por sus propiedades fisicoquímicas en catiónicos, hidrofóbicos y anfipáticos. De acuerdo con su origen pueden ser naturales, quimérico o sintéticos. A los CPP se les puede unir diferentes moléculas (cargos), tales como agentes de imagen, cargas biológicas, drogas, proteínas, ADN y ARN. Algunos mecanismos propuestos para la captación celular de los CPP son, la translocación directa, endocitosis y translocación a través de la formación de una estructura de membrana. Lo anterior depende de factores, tales como, el método de unión del cargo al CPP, la temperatura y el pH. En el presente trabajo se aislaron CPP que se encuentran en la biblioteca viral Ph.D.-Phage Display, la cual posee 10^9 combinaciones de péptidos de 12 aminoácidos. El objetivo fue identificar y aislar los péptidos capaces de translocarse a la membrana celular del ovocito de cerdo. Se realizaron cinco experimentos de manera independiente, además de tres rondas de selección (biopanning) para cada uno. Se utilizaron ovocitos de cerdo sin membranas tales como la capa de la granulosa y la zona pelúcida. Cada ronda de selección, para aislar a los CPP, consistió en incubar la biblioteca viral con los ovocitos (15-20 en cada selección) posteriormente se eliminó el virus en un primer paso por lavados celulares y finalmente por tratamiento de los ovocitos con tripsina. Se amplificó el lisado celular en *E. coli* 2738 K12 y se realizó un plaqueo viral para comprobar la existencia de bacteriófagos. A partir de dicho experimento se realizó la segunda ronda de selección y finalmente a partir de la segunda ronda de selección se realizó la tercera. Se obtuvo un total de 14 clonas virales, de las cuales 4 clonas dieron positivo a la prueba de inmunofluorescencia celular en la que se utilizaron los anticuerpos primario conejo-antiM13 y secundario ratón anti-conejo IgG-FITC.

En resumen, se identificaron 4 CPP de 12 aminoácidos de longitud, capaces de translocarse en el ovocito de cerdo.

Palabras clave: Phage Display, Aptámero peptídico, translocación

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad los seres humanos han seleccionado animales con ciertas características fenotípicas, las cuales están relacionadas con la fuerza, el tamaño, la resistencia a enfermedades, entre muchas otras. Todo ello con la finalidad de abastecer las necesidades humanas. En la actualidad, el nuevo esquema de producción de animales modificados se hace de manera rápida y eficiente haciendo uso de la ingeniería genética, la cual se basa en la manipulación de los genes. Es decir, el primer paso es la selección de la secuencia genética de interés a modificar, esta secuencia es manipulada (mutada) por técnicas de laboratorio, después de lo cual es introducida a un animal transgénico (mutantes genéticos). De esta manera hoy en día se pueden generar animales transgénicos con características deseadas, o producir animales transgénicos productores de diferentes metabolitos o proteínas terapéuticas en sus fluidos corporales (Pease y Lois, 2006).

1.1. Transferencia de información genética

1.1.1. Natural

La transferencia de información genética es un proceso natural que provoca variaciones en los rasgos biológicos de los organismos. De manera natural, la transferencia de genes puede ser vertical u horizontal. La primera consiste en la transferencia de información genética de ancestros a descendientes y se puede dar tanto en procariotas como en eucariotas, en el caso de los procariotas tenemos como ejemplo la conjugación bacteriana donde una célula donadora a través de contacto directo o a partir de estructuras especializadas, como el pili, incorpora parte de su material genético a las células receptoras. En los eucariotas esta transferencia de información genética se da a partir de la unión de las células sexuales (óvulos y espermatozoides) (Sieber *et al.*, 2017; Roger, 2018).

La transferencia horizontal (lateral) de genes consiste en transmitir la información genética de un organismo a otro, como ejemplo tenemos la infección por bacteriófagos y virus los cuales inyectan su material genético a la célula para que

esta lo incorpore a su genoma y lo replique. La transferencia de información genética horizontal es posible debido a la existencia de plásmidos, transposones, virus y bacteriófagos (Sieber *et al.*, 2017; Roger, 2018).

1.1.2 Artificial

Debido a los inconvenientes en la transferencia de genes de manera natural, se han creado técnicas de biología molecular que permiten la transferencia de información genética de manera artificial. Las técnicas convencionales y de mayor éxito y reproducibilidad se dividen en (a) físicas, como la electroporación y la microinyección; (b) químicas, como el fosfato de calcio y los liposomas; y (c) biológicas, en la cual se usan virus. Estas metodologías nos permiten incorporar material genético de interés a células y embriones de manera eficiente (Moses, 1987).

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Manipulación del genoma animal y celular

El estudio del genoma animal nos ha permitido expresar, inactivar o intercambiar genes a voluntad en algunos animales y/o líneas celulares específicas, con la finalidad de sintetizar proteínas de interés en células, tejidos u órganos diferentes a los habituales; además de crear medicamentos y producir animales resistentes a enfermedades. Todo ello puede ser aplicado a la investigación en ciencia básica, en la salud humana y biomedicina, en el desarrollo de la industria farmacéutica y en la producción ganadera (Luo *et al.*, 2012). Algunas de las técnicas y aplicaciones más comunes para crear organismos genéticamente modificados son:

- La microinyección pronuclear (MP) se puede utilizar para introducir material genético en el embrión de mamíferos, la solución se introduce en el pronúcleo del cigoto o en el citosol del óvulo, posteriormente se evalúa su viabilidad y se transfiere a una madre receptora (Bogliotti *et al.*, 2016).
- En cuanto a la transferencia de genes mediada por espermatozoides (SMGT) se refiere a una técnica utilizada por su bajo costo y fácil aplicación, consiste en incubar el ADN exógeno con el espermatozoide para que sea internalizado y posteriormente realizar la inseminación artificial para crear embriones transgénicos (Lavitrano *et al.*, 2002).
- Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), esta técnica consiste en introducir el núcleo (2n) de una célula somática (modificada o no) en un ovocito sin núcleo, posteriormente el núcleo de la célula somática es reprogramado por el ovocito y se estimula con un choque eléctrico para que comience la división celular, finalmente se deja en cultivo hasta que llegue a la etapa de blastocisto y es pasado a una hembra receptora para que termine su desarrollo (Science Daily, 2019).
- La transferencia de genes a partir de virus (Vectores virales) se basa principalmente en el uso de adenovirus, retrovirus y virus adenoasociados. Consiste en transfectar una célula con los elementos genéticos necesarios (proteínas estructurales y no estructurales) para producir un virus y el

genoma viral recombinante que porta los genes de interés, posteriormente se lisa la célula y se purifica el virus. Este virus modificado y deficiente en replicación es el que se usa para transfectar las células o embriones que se desea modificar. Es importante señalar que la construcción del virus solo lleva los elementos necesarios para formarlo, es decir, no se incorporan el o los genes encargados de la replicación viral, de esta manera se crea un virus capaz de infectar la célula pero incapaz de multiplicarse en ella (White *et al.*, 2017).

Las técnicas de transferencia de genes antes mencionadas son viables pero desafortunadamente ninguno de estos métodos es del todo eficiente. La transfección convencional de laboratorio generalmente no es apropiada para experimentos *in vivo*, estudios en animales o para la liberación de medicamentos a los pacientes. Además de ser en algunos casos técnicas lentas, costosas, peligrosas y difíciles de llevar a cabo, por lo cual otras técnicas son requeridas para transportar moléculas a través de la MP celular y modificar el genoma animal de manera rápida, en masa y eficiente (Guo *et al.*, 2016).

2.2. Característica de los Péptidos penetrantes celulares

En las últimas dos décadas se ha encontrado un número de péptidos y proteínas que han demostrado tener propiedades penetrantes celulares. Estas secuencias son llamadas péptidos penetrantes celulares (CPP, por sus siglas en inglés) también conocidos como dominios de transducción de proteínas o péptidos troyanos, los cuales se han aislado como secuencias parciales de factores de transcripción, proteínas bacterianas o virales, proteínas de superficie, toxinas receptores de membrana o proteínas de adhesión. Actualmente se han aislado mediante protocolos de biopanning de aptámeros peptídicos, los cuales pueden unirse y/o penetrar células de manera específica. Gracias a esto, los péptidos pueden transportar al interior de la célula otras moléculas capaces de alterar vías metabólicas y/o programas de expresión genética de la propia célula o de parásitos intracelulares como bacterias y virus (Gagat *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2016).

Las características bioquímicas de los aptámeros peptídicos son su tamaño pequeño (5-30 aminoácidos), su carga química neta, su afinidad por secuencias de ácidos nucleico y su capacidad de unión a otras proteínas. Paralelamente mediante metodologías químicas los péptidos o proteínas pueden ser unidos con diferentes moléculas llamadas carga, estas pueden ser proteínas, virus, secuencias genéticas de interés, polipéptidos, oligonucleótidos, nanopartículas, agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética, medicamentos entre otros (Fig.1) (Desjobert *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2016; Koren y Torchilin, 2012).

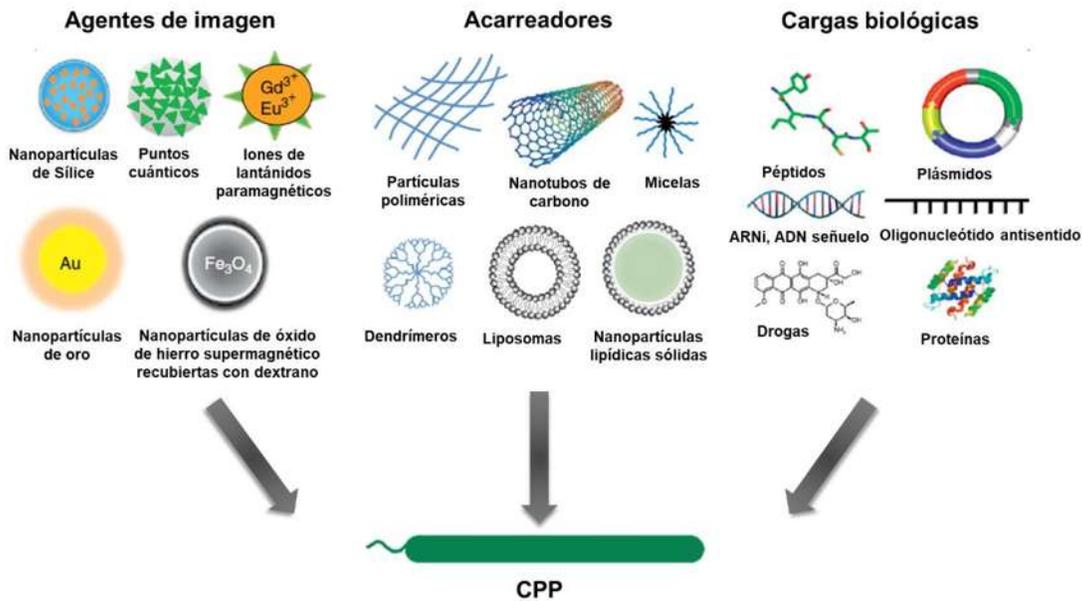


Figura 1. Tipos de cargas que se pueden unir a lo CPP. Imagen modificada de Koren y Torchilin, 2012.

2.2.1. Clasificación de los CPP

Los péptidos penetrantes celulares se clasifican de acuerdo a su origen; **a)** naturales son los producidos por el organismo, **b)** quiméricos siendo proteínas naturales modificadas y **c)** sintéticos los diseñados y sintetizados en laboratorio.

La clasificación de los CPP también puede darse de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas:

- **Catiónicos.** Los cuales poseen carga positiva, la mayoría son secuencias de origen natural ricas en arginina y lisina. En el caso de CPP con una gran cantidad de arginina se ha visto que presentan interacciones electrostáticas con glicoproteínas de la superficie cargadas negativamente. Dicha interacción se da a partir de enlaces de hidrógeno entre el grupo guanidina de la arginina y los fosfatos o sulfatos negativos de la membrana. Algunos CPP conocidos son la proteína Tat del virus del sida y las oligoargininas (Koren y Torchilin, 2012; Gagat *et al.*, 2017).
- **Hidrofóbicos.** Se derivan de secuencias de péptidos señal y están compuestos solo por aminoácidos apolares (hidrofóbicos) como alanina, metionina y/o valina, su mecanismo de captación celular es el menos estudiado aquí podemos encontrarnos a los CPP transportan, SG3, el factor de crecimiento de fibroblastos entre otros (Gagat *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2016).
- **Anfipáticos.** Son CPP quiméricos, presentan un fragmento hidrofóbico y otro hidrofílico. Se obtiene a partir de la unión covalente entre un dominio hidrófobo y una secuencia de localización nuclear (NLS), como MAP y MPG además, son ricos en prolina (Gagat *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2016).

2.2.2. Métodos para unir moléculas carga a los CPP

Actualmente ya se conocen cientos de CPP, sin embargo, solo unos cuantos se utilizan en aplicaciones comerciales, debido al poco conocimiento que existe sobre sus propiedades y mecanismos de captación en las células. Lo que se conoce sobre estos aptámeros es que la carga y el CPP se unen a partir de enlaces covalentes (enlace peptídico, enlace maleimida, enlace disulfuro, enlace de sulfanilo (bi-funcional), y fosfatildiletanolamina) y no covalente (unión dependiente de la carga). El enlace covalente es más estable y puede provocar una reacción química durante la formación del enlace, modificando las propiedades de la carga o el CPP y no puede ser usado para unir ADN, por otro lado la formación de

enlaces no covalentes son solo interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, las cuales permiten unir ADN y eliminan el riesgo de modificar la actividad biológica de la carga o el CPP, además de ser un método más simple de llevar a cabo que el enlace covalente (Fig. 2) (Gagat *et al.*, 2017; Koren y Torchilin, 2012).

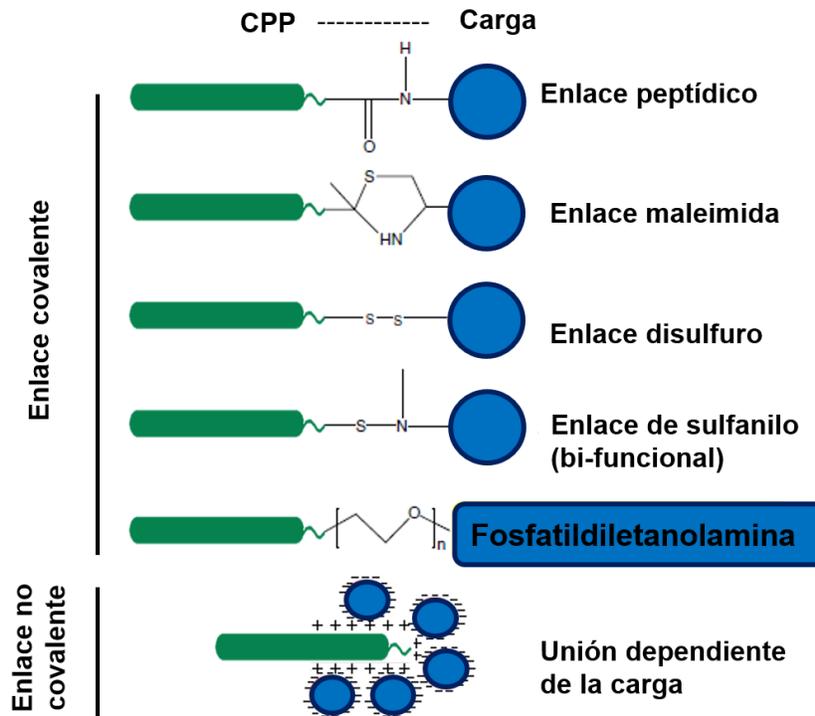


Figura 2. Enlace covalente (enlace peptídico, enlace maleimida, enlace disulfuro, enlace de sulfanilo (bi-funcional), y fosfatidiletanolamina) y no covalente (interacciones electrostáticas e hidrofóbicas) para unir CPP con su carga. Imagen modificada de Koren y Torchilin, 2012.

2.2.3. Mecanismos de internalización celular de los CPP

La internalización de los CPP en las células depende de varios factores como, la composición de la membrana plasmática, la masa y estructura de la carga, el método de unión entre la carga y el CPP, el tipo y la concentración del CPP y algunos parámetros fisicoquímicos (la temperatura y el tiempo de incubación). Los mecanismos a partir del cual el CPP penetra a las células no está del todo claro, sin embargo, actualmente se ha demostrado que existen tres mecanismos para la

translocación de CPP a través de la membrana celular (Fig. 3), los cuales se describen a continuación:

Translocación directa. Es independiente de energía y se da a partir de varios modelos: 1) modelo de carpeta, los CPP desestabilizan transitoriamente la membrana celular por su asociación con su superficie, lo que lleva a la reorganización de los fosfolípidos; 2) la formación de poros, que puede ser: modelo de poro toroidal, donde los CPP interactúan con grupos polares de fosfolípidos de membrana y el modelo de bastón de barril, aquí los CPP asumen una estructura de hélice α anfipática cuando se insertan en el membrana celular; 3) el modelo de adelgazamiento de la membrana, este tipo de translocación se presenta en los CPP anfifílicos catiónicos, se insertan en la superficie de la bicapa lipídica desestabilizándola por la diferencia de cargas y provocan la expansión del área de la membrana en la cual se insertaron; y 4) micelas invertidas, los CPP alteran la bicapa lipídica, lo que lleva a la formación de estructuras hexagonales invertidas. En este mecanismo el CPP se une a la membrana celular a partir de interacciones electroestáticas o hidrófobas e inducen una desestabilización en la membrana celular en los sitios de unión, lo que lleva a la entrada de los CPP a la célula. La cantidad de CPP internalizados depende de la concentración y la secuencia del CPP y la composición lipídica de la membrana (Guo *et al.*, 2016; Gagat *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2005, Grage *et al.*, 2016).

Translocación mediada por endocitosis. Esta vía puede ser independiente o dependiente de energía, se lleva a cabo por las vías: 1) fagocitosis, La célula emite un pseudópodo que engloba el CPP y lo introduce dentro de la célula, este mecanismo se utiliza para la absorción de partículas grandes; 2) pinocitosis, es una invaginación cubierta por clatrina sobre la membrana que rodea al CPP y forma una vesícula para su absorción; y 3) recubrimiento de moléculas transportadas por clatrina polimerizada, aquí un dímero penetrante se combina con los fosfolípidos negativos que conducen a la formación de una micela invertida dentro de la bicapa lipídica. Mecanismo utilizado por los péptidos ricos en arginina. Este tipo de translocación también puede ser independiente de energía donde nos

encontramos 1) macropinocitosis, es una evaginación, con forma de ola, que cae sobre la membrana y forma una vesícula interna la cual introduce al CPP; y 2) caveolas, estas son pequeñas invaginaciones en la membrana que se transforman en vesículas y es un mecanismo mediante el cual algunos virus y bacterias atraviesan la membrana celular y que los CPP derivados virus pueden utilizar este mecanismo (Guo *et al.*, 2016; Fittipaldi *et al.* 2003; Gagat *et al.*, 2017).

Se cree que la endocitosis es la principal vía de captación celular. Además es probable que un mismo CPP penetre de distinta forma en distintos tipos celulares o que se introduzca por diferentes vías en un mismo tipo celular (Guo *et al.*, 2016).

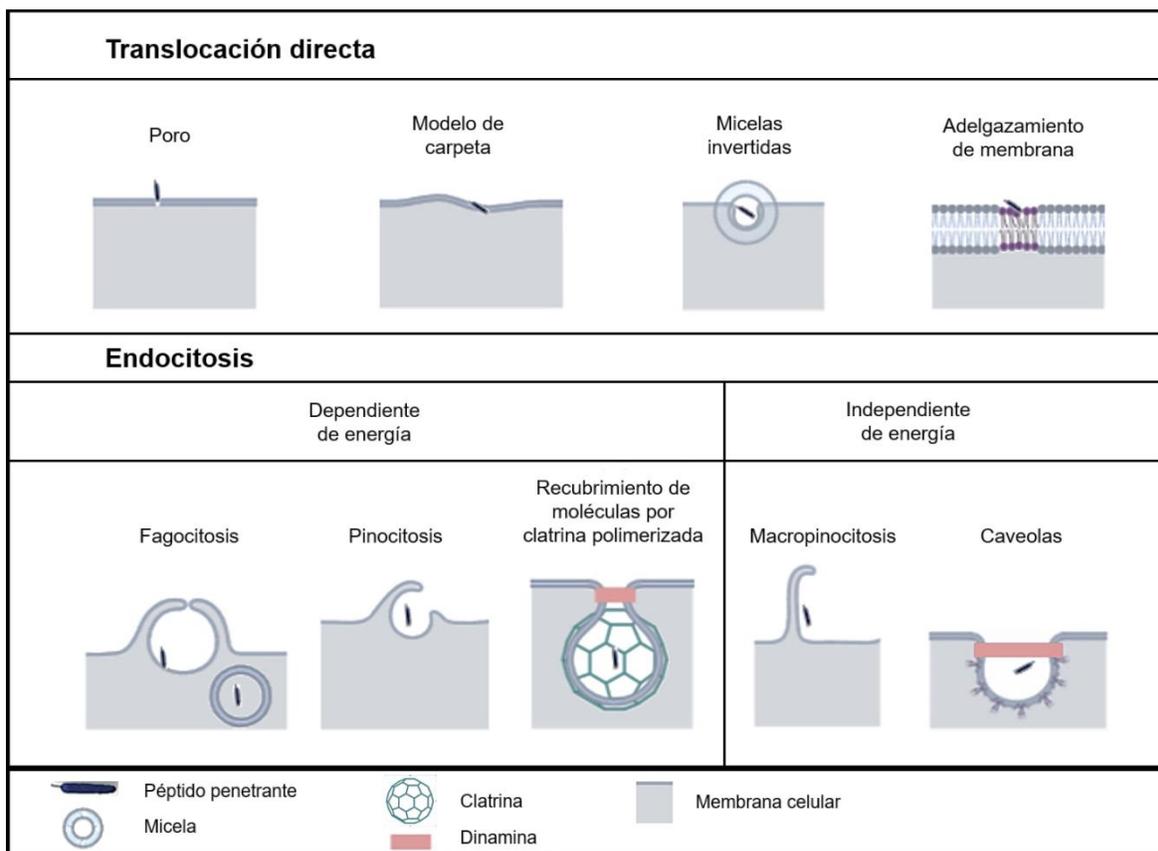


Figura 3. Mecanismos de internalización celular de los CPP: translocación directa y endocitosis translocación directa: 1) Formación de poros transitorios (el modelo de poro toroidal y el modelo de bastón de barril), 2) el modelo de carpeta, 3) micelas invertidas y 4) adelgazamiento de membrana. La translocación por endocitosis puede ser: Dependiente de energía: 1) fagocitosis, 2) pinocitosis, y 3) recubrimiento de moléculas por clatrina polimerizada e independiente de energía: 1) macropinocitosis y 2) caveolas. Elaborada en Biorender, 2020.

2.2.4. Aplicaciones de los CPP

Como se mencionó anteriormente los CPP tiene la capacidad de entregar distintos tipos de moléculas de manera exitosa sin causar daño celular *in vivo*, por ello se está desarrollando una amplia gama de aplicaciones, entre las cuales se encuentran:

- **Agentes de imagen.** Los CPP funcionan como vectores para transportar partículas fluorescentes a las células con la finalidad de visualizar y cuantificar biomarcadores o procesos bioquímicos y celulares, detectar el estadio de las enfermedades, identificar la extensión de la enfermedad y medir el efecto del tratamiento (Guo *et al.*, 2016).
- **Terapia del tumor.** La quimioterapia presenta efectos secundarios en los pacientes con algún tipo de cáncer provocado por la falta de especificidad. Actualmente la conjugación de agentes anticancerígenos (bleomicina) con CPP ha mejorado la terapia del tumor, esto se debe a que los tratamientos anticancerígenos administrados por CPP aumentan la permeabilidad de los fármacos contra el cáncer en la membrana celular para atacar las células tumorales (Guo *et al.*, 2016).
- **Suministro de ácidos nucleicos y proteínas.** Las moléculas de gran tamaño como los ácidos nucleicos y las proteínas no son capaces de cruzar la membrana celular, no obstante, la conjugación de estas macromoléculas con CPP facilita su captación celular. Como ejemplo se muestra el ARNip, el cual se ha utilizado ampliamente para silenciar genes y para tratar enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas y trastornos genéticos (Guo *et al.*, 2016).
- **Dirigir la diferenciación de células madre pluripotentes (iPS).** La administración de moléculas determinadas a las células iPS puede generar la diferenciación específica de tipo celular, que pueden ser utilizadas para tratar enfermedades y crear fármacos y terapias de trasplante celular, sin embargo, estas aplicaciones están limitadas ya que las células iPS son

difíciles de transfectar, además es riesgoso, ya que se hace a partir del uso de herramientas de administración con lentivirus o adenovirus, presentando el riesgo de integración genómica de genes virales exógenos. La transfección de ADN plasmídico a partir de un CPP presenta una herramienta importante para entregar proteínas exógenas a las células iPS, eliminando el riesgo de integración genómica exógena y promoviendo una alta eficiencia de transducción (Guo *et al.*, 2016).

2.2.5. Toxicidad de CPP

Es importante señalar que los CPP pueden presentar efectos citotóxicos y esto depende del tipo celular que se use, la secuencia de aminoácidos, la concentración de CPP y la carga total del CPP unido su molécula carga. Algunos estudios reportados hasta el momento nos muestran que, se debe tener en cuenta que los CPP largos y anfipáticos (Map y Transportan 10) pueden afectar la membrana celular más que los CPP catiónicos (Tat, pVEC, pAntp y penetratina) (El-Andaloussi *et al.*, 2007).

Las anomalías celulares vistas hasta el momento son fugas citoplasmáticas y disfunción en las proteínas de la membrana celular como resultado de interacciones con CPP (Gagat *et al.*, 2017). La toxicidad causada por CPP puede ser analizada por diferentes ensayos, entre ellos nos encontramos el ensayo DiBAC 4 (3), el de fuga de lactato deshidrogenasa (LDH), el de fuga de 2-desoxi-d- [1-H3] glucosa-6-fosfato, el de fuga de calceína AM y el de entrada de etidio homodímero-1 (Valkna *et al.*, 2002; Saar *et al.*, 2005).

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

3.1. Aplicación de CPP en células germinales

En las últimas décadas se han encontrado un gran número de CPP capaces de translocar la membrana celular de las células germinales (ovocito y espermatozoide) o embriones y generar modificaciones genéticas, entre los cuales nos encontramos el CPP crotamina, Campelo y *cols.* (2016), analizaron la capacidad de la crotamina para translocarse en embriones de bovino a partir de

embriones partenogénicos (PA) y fertilización *in vitro* (FIV). Realizaron tres experimentos: en el primero se sometieron los embriones PA y FIV a cuatro intervalos de tiempo diferentes en crotamina marcada, con colorante RhoB en el extremo N-terminal, el segundo experimento consistió en medir el grado de toxicidad del CPP en embriones PA y finalmente el tercer experimento fue la transfección de embriones de FIV con complejo estable de ADN-crotamina.

A partir de esto encontraron que el CPP crotamina fue captado por los embriones de PA y FIV 1 h después de la exposición. La exposición a la crotamina no afectó a embriones de dos a ocho células y las tasas de blastocistos o el número de células de blastocistos de los embriones de PA. En cuanto al tercer experimento la exposición o la inyección en el espacio perivitelino con el complejo de ADN-crotamina no dio lugar a embriones que expresan el transgén. Sin embargo, la inyección intracitoplasmática de plásmido solo mostró tasas de expresión más altas que la inyección con complejo de crotamina-ADN en los días 4 y 7.

En otro trabajo Kwon y *co/s.* (2013), probaron el CPP LDP12 (TAPKRKRTKTKK) derivado de la región conservada de proteína L1 de la cápside del virus del papiloma humano (HPV). El objetivo de este trabajo fue observar si el péptido, LDP12, entrega de manera eficiente una proteína en ovocitos de ratón y embriones preimplantados. Para ello prepararon la proteína de fusión LDP12-EGFP, esta proteína se introduce fácilmente en células HeLa. LDP12 – EGFP muestra una transducción eficiente en blastocistos de ratón, pero no en ovocitos, embriones preimplantados de dos células o mórula.

En el caso de los espermatozoides de bovino, estos son incapaces de macropinocitosis o endocitosis mediada por clatrina, mecanismos que facilitan la entrada de los CPP. Por lo tanto, la entrada de CPP tiene que ser a partir de translocación directa, mecanismo que utilizan principalmente los CPP catiónicos; para este estudio se utilizaron los CPP Tat, Penetratina, C150Y, Mitoparan, Mitoparan inverso, Maztoparan inverso y Transportan 10 (Jones *et al.*, 2013).

Los CPP se prepararon mediante síntesis en fase sólida manual, automatizada y mejorada con microondas. Para determinar la distribución intracelular de los CPP conjugados con rodamina, se utilizó microscopía de fluorescencia confocal. La captación cuantitativa y los análisis cinéticos compararon las eficiencias de la translocación de los CPP químicamente diversos, biotinilados y conjugados con la proteína avidina, además se emplearon ensayos de conversión de sal interna (MTS) para analizar la influencia de los CPP sobre la viabilidad de las células espermáticas, los ensayos de clase espermática determinaron el impacto de los CPP en la motilidad de muestras humanas capacitadas y no capacitadas, encontrando que todos son capaces para translocarse en el espermatozoide de bovino sin perjudicar la viabilidad celular o la motilidad; sin embargo, no son del todo eficientes para el transporte de proteínas de gran peso (66 kD) (Jones *et al.*, 2013).

Los estudios anteriores representan un avance para hacer uso de los CPP como acarreadores de moléculas para la modificación de organismos desde el desarrollo embrionario.

3.2. Técnica de presentación molecular en fagos (Phage Display)

Los CPP pueden obtenerse de manera sintética a partir del método conocido como presentación de fagos (phage display en inglés), esta técnica fue desarrollada por Smith en 1985, quién en 2018 recibió el Premio Nobel de Química por este trabajo. Consiste en la selección de una biblioteca de variantes de péptidos o proteínas que se expresan en una de las proteínas de recubrimiento del fago, mientras que el material genético que codifica cada variante reside en el interior. Esto crea un enlace físico entre cada secuencia de proteína variante y el ADN que lo codifica, lo que permite una participación basada en la afinidad de unión a una molécula diana determinada mediante un proceso de selección *in vitro* llamado “panning” (New Englan Biolabs, 2017; Pande *et al.*, 2010).

El bacteriófago M13KE es utilizado para la implementación de este método puesto que presenta una estructura flexible y alargada de ~880 nm de longitud y 6.6 nm de ancho, es un bacteriófago filamentoso lisogénico de ADN monocatenario

circular de 6000 a 8000 pb, se le pueden introducir sitios de clonación en el extremo 5´ de la cubierta menor de la proteína pIII y en la proteína mayor pVIII. El material genético es replicado y empaquetado por la célula huésped y liberado a través de un canal de poros proteicos en la membrana bacteriana, sin alterar la pared celular. El crecimiento bacteriano continúa después de la infección proporcionando una ventaja para la amplificación masiva de los fagos (New England Biolabs, 2017; Pande *et al.*, 2010).

La cápside del fago está conformada por 2,700 copias de la proteína de cubierta mayor (pVIII) y 5 copias de proteínas de cubierta menor pIII, pVI, pIX y pVII que rodean al ADNss circular. La proteína pVIII de 50 residuos representa el 98% de la masa del fago y constituye la pared lateral del cuerpo, El dominio N-terminal se encuentra expuesto, lo que le permite ser un blanco para la incorporación de aminoácidos, sin embargo, la ingeniería genética en esta proteína es menos común porque los monómeros pVIII solo pueden tolerar la incorporación de 6 a 8 aminoácidos. Las cinco copias de cada una de las proteínas pVII y pIX están en una punta, y las cinco copias de las proteínas pIII y pVI están en la otra punta distal. La proteína de cubierta menor pIII, presenta aproximadamente 406 residuos, esta proteína modula la infectividad del fago a partir su unión con el receptor de F-pilis de la bacteria *E. coli* ER2738K (cepa masculina), por ello es la más utilizada en la presentación de fagos, además de tener menos copias que pVIII, presentar accesibilidad a su N-terminal y permitir la inserción de varias longitudes de péptidos, incluidas proteínas grandes (> 100 aminoácidos) (Fig. 4). Dichas modificaciones hacen a este fago único en ingeniería genética (Cao *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2014; Pande *et.al.* 2010).

El tamaño del péptido que se inserta en la proteína de cubierta elegida limita el uso de la técnica de presentación de fagos puesto que los péptidos de gran tamaño pueden interferir en la fusión de la proteína de cubierta, en el empaquetamiento del fago y la infección bacteriana (Pande *et al.*, 2010).

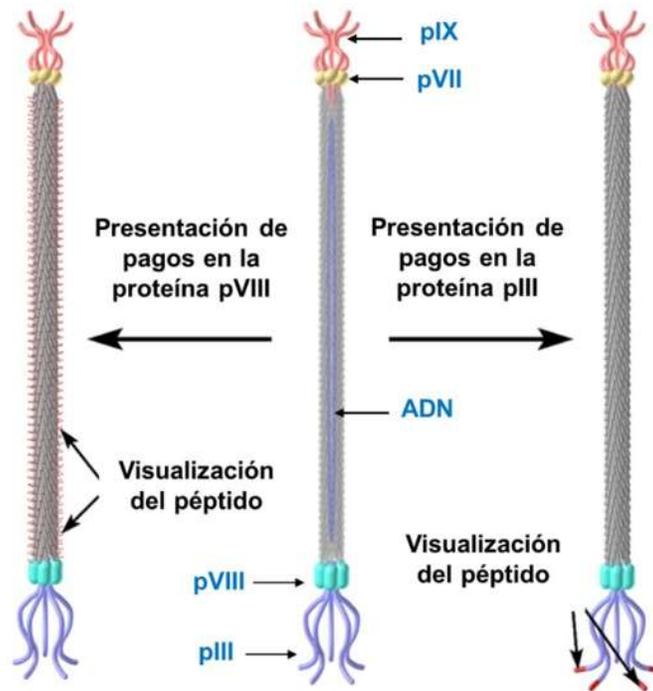


Figura 4. Estructura del fago M13 y sus sitios para la fusión genética de péptidos. Imagen modificada de Cao *et al.*, 2016.

La técnica de presentación de fagos utilizada para la presente investigación se realizó a partir de la unión entre la biblioteca de péptidos (10^9 combinaciones) y el bacteriófago M13 en una secuencia corta de aminoácidos (Gly-Gly-Ser) y la fusión N-terminal. Al insertar secuencias cortas en el vector M13, se permite que se replique como fago y no como plásmido, por lo tanto, no lleva un replicón de plásmido ni resistencia a antibióticos lo que simplifica los pasos de amplificación durante el biopanning, puesto que no es necesario expresar los genes para los antibióticos. El fago también lleva clonado la secuencia $lacZ\alpha$ que se insertó cerca del origen de replicación de la cadena (+) (Fig. 5) (New Englan Biolabs, 2017).

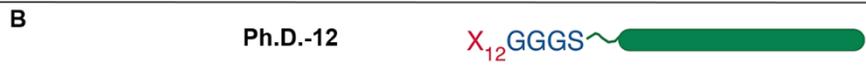
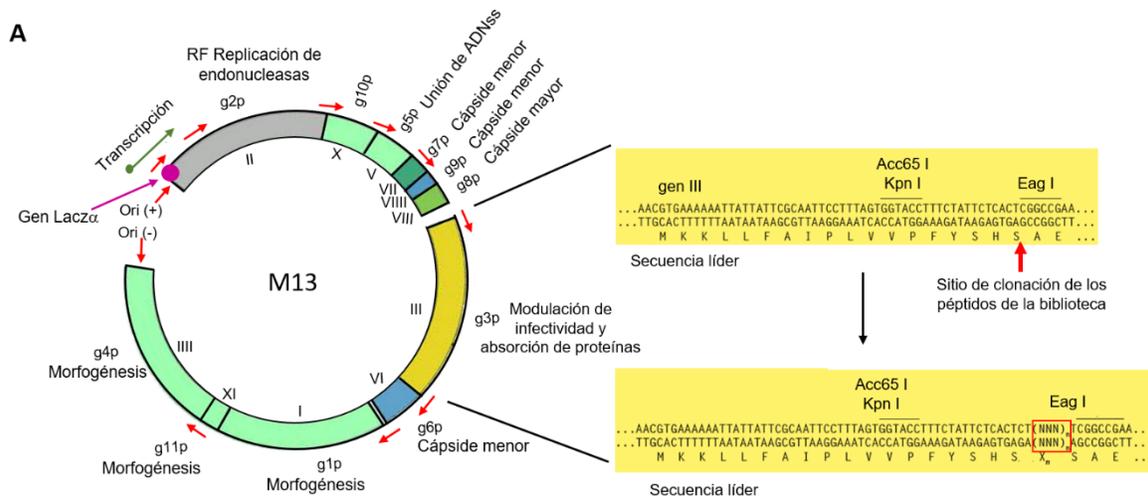


Figura 5. A) Muestra el genoma del Bacteriófago M13 y la secuencia del sitio de clonación de la biblioteca de CPP en la proteína pIII en el extremo 5'. B) Enlace entre el péptido de la biblioteca y las proteínas pIII. X₁₂ en color rojo representas los péptidos de la biblioteca (Ph.D.-12), en azul la secuencia corta de aminoácidos que une a la biblioteca con el fago (glicina-glisina-glicina-serina) y en verde la proteína pIII del fago M13. Imagen modificada de studocu.com y New Englan Biolabs 2017.

3.3. El cerdo como modelo de investigación

Existe una gran variedad de especies animales que se utilizan en investigaciones biomédicas, sin embargo, el cerdo es de gran importancia debido a que presentan una gran similitud fisiológica, anatómica e inmunológica con el humano. Además, son animales con una tasa de reproducción alta, muestran madurez sexual temprana (5-8 meses), la distancia entre sus generaciones son de aproximadamente 1 año, lo cual permite a la ingeniería genética modificarlo eficientemente para simular enfermedades humanas y poder trabajar en ellas con éxito (Aigne *et al.*, 2010).

Algunos padecimientos que se han trabajado con el cerdo son trastornos metabólicos, Yin y cols. (2019), crearon cerdos MC3R KO con la finalidad de comprender si había alguna relación de este gen con la obesidad en cerdos ya

que en humanos se sabe que alteraciones de este gen se relacionan con la obesidad. Encontraron que los cerdos MC3R KO presentan obesidad, de esta manera se puede tomar al cerdo como modelo de estudio para la obesidad en humanos. En otras investigaciones se ha buscado crear cerdos sin pelo para estudios de la piel (sensibilidad, cáncer etc.) como ejemplo tenemos que a través de la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) y la construcción del vector lentiviral que presentaba los genes Tibet minipig DKK1 y GFP conducidos por el promotor K14, lograron clonar y expresar de manera específica el transgén DKK y GFP en la piel del cerdo, sin embargo los cerdos no presentaron un fenotipo sin pelo como se ha logrado en otras investigaciones en ratón, a pesar de esto se logró abrir las puertas a nuevas investigaciones sobre las funciones del gen DKK1 en cerdos.

4. JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes técnicas artificiales de transferencia de genes o moléculas a las células; estas pueden ser caras, complicadas, tóxicas para la célula o de eficiencia variable. Es importante investigar y desarrollar técnicas eficientes y masivas para la manipulación del genoma celular (espermatozoides, ovocitos o embriones) para obtener de forma fácil y eficiente animales modificados genéticamente (transgénicos). En este trabajo se propone investigar cuantas variantes peptídicas presenta la biblioteca Phage Display de 12 aa que sean capaces de translocarse en el ovocito de cerdo desnudo, que a futuro nos permita modificar el genoma celular evitando los problemas antes señalados. El uso de péptidos penetrantes celulares (aptámeros) no tóxicos, podrían ser de alta eficiencia para la transferencia de genes a los embriones de los animales de granja.

5. HIPÓTESIS

La biblioteca viral Phage Display de 12 aa (New England Biolabs) contiene péptidos (aptámeros) capaces de penetrar la membrana celular de los ovocitos de cerdo.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar y aislar bacteriófagos con péptidos penetrantes (aptámeros) capaces de translocar la membrana celular de ovocitos de cerdo.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selección de fagos-aptámero penetrantes de ovocitos de cerdo.
2. Clonación molecular de fagos-aptámero penetrantes de ovocitos de cerdo.
3. Determinación de la penetración de fagos-aptámero penetrantes en ovocitos de cerdo.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el proyecto se utilizara principalmente: ovarios de cerdo; ovocitos de cerdo; biblioteca viral (con 12 aminoácidos 10^9 combinaciones); bacteria de la cepa *E. coli* K12 (2138); anticuerpo de conejo-antiM13 primario y un secundario de ratón anti-conejo IgG-FITC; **Error! Marcador no definido..**

El método de manipulación viral se basa en el manual de Ph.D.TM Phage display libraries (2017), de New Englan Biolabs modificado para el presente estudio.

8.1. Amplificación y titulación de la biblioteca viral (PhD-Phage Display)

Se realizó la amplificación de la biblioteca viral a partir de infección bacteriana: en condiciones estériles. Para lo cual se mezclaron 5 μ l de bacteriófago (PhD-Phage Display) en 15 ml de *E. coli* K12 (DO. 0.3). Posteriormente se incubó por ocho horas en agitación a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 4,000 rpm/10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante (clarificado) se colectó en un tubo nuevo y se almacenó a 4 °C para su posterior titulación por plaqueo viral.

Para la titulación se sembraron 100 μ l de *E. coli* K12 (2738) en 2 ml de medio Luria Bertani (LB) y se incubó a 37 °C en agitación, hasta obtener una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.3-0.5 (2.5 horas aproximadamente). Se realizó una dilución seriada con el factor de dilución de 1/10 de la biblioteca viral hasta la dilución 1/100, 000, 000, es decir 10^{-8} . Posteriormente de manera independiente se Infectaron 50 μ l de *E. coli* K12 (2738) con 2 μ l de las diluciones 10^{-2} a 10^{-8} del virus y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron los 52 μ l de la infección a la solución de top-agarosa, preservada a 49 °C, se mezcló y se sembró en cajas tibias de LB-Agar con Tetraciclina a 20 mg/ml. Se incubaron las cajas a 37°C por 24 horas, finalmente se observaron y se contaron las placas de lisis. Para conocer el título viral, se multiplicó el número de placas por el factor de dilución, obteniendo el título en unidades formadoras de placas (pfu) por mililitro.

8.2. Obtención de los ovocitos de cerdo

Los ovarios fueron colectados del rastro municipal de Morelia y del rastro de Medicina Veterinaria de la UMSNH. Se transportaron al laboratorio en PBS con antibiótico, en un tiempo no mayor a 3-4 horas post-sacrificio. En el laboratorio cada folículo ovárico se puncionó con una jeringa de 10 ml y aguja de calibre 20G 1^{1/2}, colectando los ovocitos en sus diferentes estados de maduración. El total del fluido colectado se reunió en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1,000 rpm / 5 min, se colectó la pastilla y se lavó con PBS dos veces, y se adicionó 300 µl de hialuronidasa (Sigma Lot. 125H7030) al 0.40% y se dejó 20 min a 37 °C para la eliminación de las células de granulosa de los ovocitos. Después de la incubación se centrifugaron los óvulos a 1,000 rpm / 5 min con la finalidad de eliminar la hialuronidasa y se adicionó 300 µl PBS, para evitar que se deshidrataran los ovocitos (Mahadevan y Trounson, 1985 y De Vos *et al.*, 2008).

Los ovocitos se vertieron a una caja Petri y se observó bajo microscopio estereoscópico que carecieran de la capa de la granulosa, una vez limpios, se pasaron a un tubo y se centrifugaron a 1,000 rpm / 5 min, se recuperó la pastilla, se le adicionó 200 µl de Solución Ácida Tyrodes (Merck Lot. 3089931) y se incubaron 5 minutos a 40 °C, dicha solución eliminó la zona pelúcida del ovocito. Se seleccionaron los ovocitos sin zona pelúcida bajo el microscopio estereoscópico con la ayuda de una pipeta Pasteur y se pasaron a un portaobjetos cóncavo para realizar el biopanning (Jannaman y Hansen 2018 y Yano *et al.*, 2007).

8.3. Biopanning *in vitro* en ovocitos

Para este proceso se emplearon 100 µl de la biblioteca PhD-Phage Display amplificada por cada 15-20 ovocitos. La interacción virus-célula se dejó por 30 min a 37 °C. Los ovocitos se lavaron dos veces con PBS para eliminar cualquier fago no unido al ovocito y después fueron incubados con tripsina 0.25% por 20 min a 37 °C para eliminar cualquier fago unido a la membrana del ovocito. Finalmente las células fueron lavadas con PBS dos veces más y se colectaron en 50 µl de PBS.

Para obtener los fagos que fueron capaces de internalizarse en los ovocitos, se lisó el ovocito por congelamiento y descongelamiento. Los ovocitos fueron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tres minutos durante tres rondas. Una vez lisados, la solución celular fue incubada con 20 ml de *E. coli* (DO_{600} 0.01-0.05) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación durante 4.5 horas para la nueva producción viral. Pasado el tiempo, se vertió la infección a tubos y se centrifugaron a 3,800 rpm / 10 min, se recuperó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó, con la finalidad de limpiar el sobrenadante y se refrigeró a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este proceso se realizó en 5 experimentos con 3 rondas cada uno, utilizando siempre el virus obtenido de la ronda anterior con la finalidad de amplificar y hacer en cada ronda más específico el o los bacteriófagos que penetraron las células gaméticas (Fig. 6). Al final de cada ronda de selección se realizó plaqueo viral con IPTG y X-Gal utilizando las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} para corroborar la presencia de bacteriófagos.

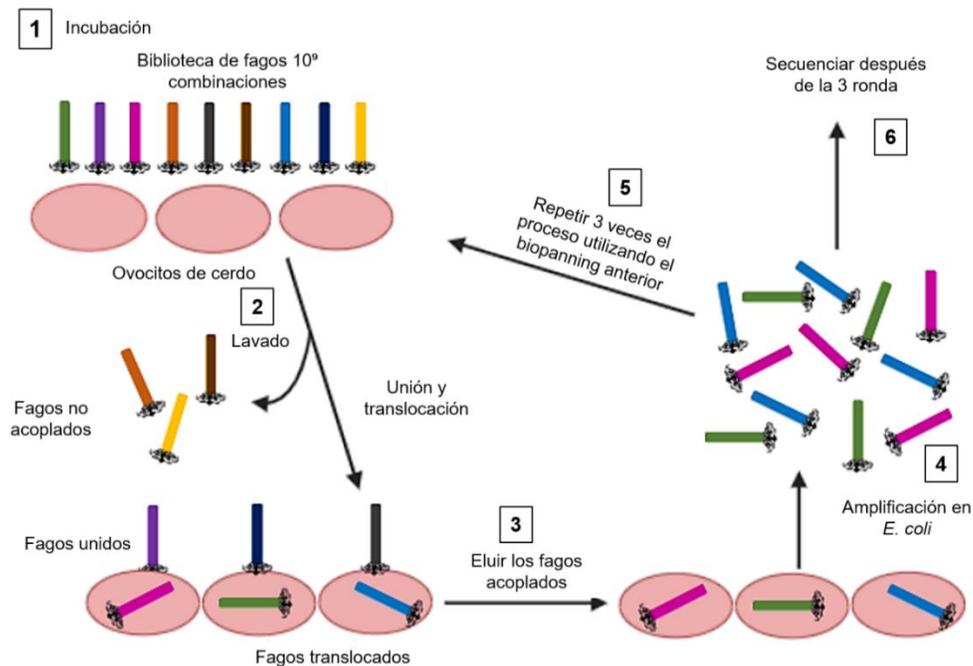


Figura 6. Biopanning en ovocitos de cerdo. 1) Incubar los ovocitos con la biblioteca viral. 2) Lavar los ovocitos para eliminar fagos no acoplados al ovocito. 3) Eluir los fagos unidos a la membrana del ovocito. 4) lisar y amplificar el contenido de los ovocitos en *E. coli* 2738K. 5) Repetir el procedimiento tres veces utilizando los fagos obtenidos de la ronda anterior. 6) Después de la tercera ronda de selección extraer el ADN y mandar secuenciar. Creado en BioRender, 2020.

8.4. Inmunocitoquímica celular

La detección del virus en el interior de ovocito se realizó a partir de una inmunohistoquímica indirecta. Para ello primero se realizó la extracción, limpieza y selección de los ovocitos. A continuación, se separaron en 14 muestras, cada muestra contenía de 3-5 ovocitos, se le adicionó a cada muestra 100 µl de virus, cada muestra contenía el virus de una clona. Se incubó 20 minutos a 37 °C, consecutivamente se lavaron 3 veces con PBS, para eliminar cualquier fago acoplado a la membrana de ovocito se adiciono 100 µl de tripsina 0.25% por 20 minutos a 37°C. Finalmente fueron lavados con PBS dos veces más y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en 100 µl de paraformaldehído al 2%, esto para fijarlos, a continuación se lavaron 3 veces con PBS y se les adicionó suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10% (Sigma Lot. 063K0778), durante 2 horas para bloquear y mantener el pH.

Una vez fijados se adicionaron 100 µl del primer anticuerpo conejo-antiM13 (1:1000) producido en el laboratorio CMEB-UMSNH, se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se les agregaron 100 µl del segundo anticuerpo cabra anti-conejo (1:4000) de la compañía Santa Cruz, nuevamente se incubaron 2 horas, posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se les adicionó fosfatasa alcalina (HP) para hacer el revelado. Se tomaron fotografías en el tiempo cero, tres, cinco y diez minutos.

8.5. Inmunofluorescencia celular

Para la detección de virus al interior del ovocito se separaron los ovocitos extraídos en dos muestras, cada muestra contenía de 5-10 ovocitos, se le adicionó a cada muestra 25 µl de virus de cada clona, el grupo 1 contenía el virus de las clonas 1-7 y el grupo 2 las clonas 6-14, (se dividieron en dos grupos para hacer más rápida la prueba y posteriormente solo revisar las clonas de manera independiente de las muestras positivas). Seguido a la infección viral, los ovocitos se fijaron en 100 µl de paraformaldehído al 2%, incubándolos 20 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron en 100 µl de gelatina de puerco al 0.05%, se dejó incubando 1 hora y se

lavaron tres veces con PBS, se le adicionó 100 µl del primer anticuerpo (conejo-anti M13) diluido 1:500 en PBS y se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron 100 µl del segundo anticuerpo, ratón anti-conejo-FITC de la compañía Santa Cruz, diluido el PBS (1:100), nuevamente, se dejó incubar 2 horas, pasado el tiempo se lavaron tres veces con PBS y se suspendieron en PBS para su observación al microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías.

8.6. Extracción de ADN viral

Para extraer el material genético de los fagos obtenidos, se transfirieron 500 µl de virus aislado de la clona a un tubo, se le adicionaron 200 µl de PEG al 20%/NaCl a 2.5 M y se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm / 10 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 100 µl de buffer de yoduro, se agitó vigorosamente y se le adicionaron 250 µl de etanol puro grado biología molecular, posteriormente se incubó 10 min a temperatura ambiente. Esta incubación permite precipitar el ADN viral y dejar la mayoría de las proteínas del fago en solución. Finalmente se centrifugó a 14,000 rpm / 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se adicionaron 500 µl de etanol grado biología molecular al 70% y se decantó. Se dejó secar el sedimento con el tubo boca abajo.

La pastilla fue suspendida en 30 µl de buffer TE y se almacenó a -20 °C. Para verificar la integridad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La concentración y pureza se midieron a partir de espectrofotometría a una a absorbancia de 260 y 260/280 respectivamente.

8.7. Análisis estadístico

Para el análisis de datos, se realizó cada experimento por triplicado, se obtuvo un promedio y se adquirió el porcentaje, los datos se pasaron al programa GraphPad Prism para su análisis. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con prueba de Tukey con una $P < 0.05$ y $N=3$ (Petrie y Watson, 2013).

9. RESULTADOS

9.1. Amplificación y titulación de la biblioteca viral

La biblioteca de péptidos exhibidos en el bacteriófago M13, se amplificó para obtener la solución stock de trabajo. Una vez amplificada se realizó la titulación a través de diluciones seriadas de base 10 (1/10). Para el conteo de placas virales utilizamos un aproximado de 100 placas (clonas), de esta manera se realizó un conteo claro de acuerdo a lo recomendado por el manual, la dilución 10^{-8} presentó el intervalo recomendado proporcionando entre 90 y 130 placas independientes. El experimento se realizó por triplicado y se contaron las placas de los tres experimentos para obtener el promedio (105.66 placas en promedio) obteniendo de esta manera 1×10^{10} UFP/ml de la biblioteca amplificada (Fig. 6).

9.2. Obtención y manejo de los ovocitos de cerdo

De cada 10 ovarios, en promedio se extrajeron por punción ovárica 70 ovocitos, estos se encontraron en los diferentes grados de maduración; estado 1 corresponde a la ovogonia, estado 2 al ovocito primario y el estado 3 al ovocito secundario (Fig. 7).

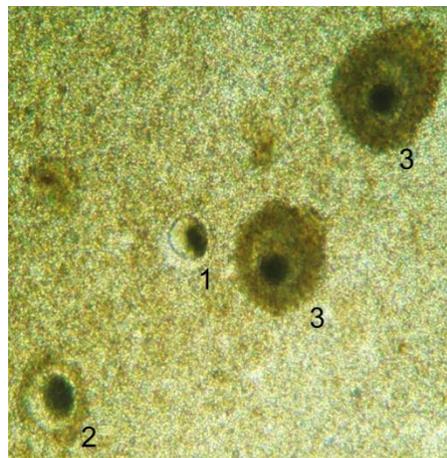


Figura 7. Ovocitos en sus diferentes estadios. Estado 1: ovogonia, estado 2: ovocito primario y estado 3: ovocito secundario.

Para limpiar el ovocito primero se realizó la eliminación de la capa de la granulosa (Fig. 10). Se utilizaron las concentraciones 0.2%, 0.3% y 0.4% de hialuronidasa de bovino a 37 °C, en distintos tiempos (15, 20, 30 y 40 min), con la finalidad de observar las condiciones óptimas que eliminan de manera rápida y en su totalidad la granulosa de los ovocitos. La concentración efectiva fue 0.40% en 20 min, eliminado en el 81% de los ovocitos la zona de la granulosa, un 22% más que la concentración a 0.30% en 20 min, la cual presenta un 59% de eficiencia y al comparar la concentración de 0.20 % con 0.40% en los tiempos 15 y 20 min encontramos una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de ovocitos libres de la granulosa entre los tratamientos (Fig. 8). Además, es importante señalar que no se presentaron daños en la morfología del ovocito.

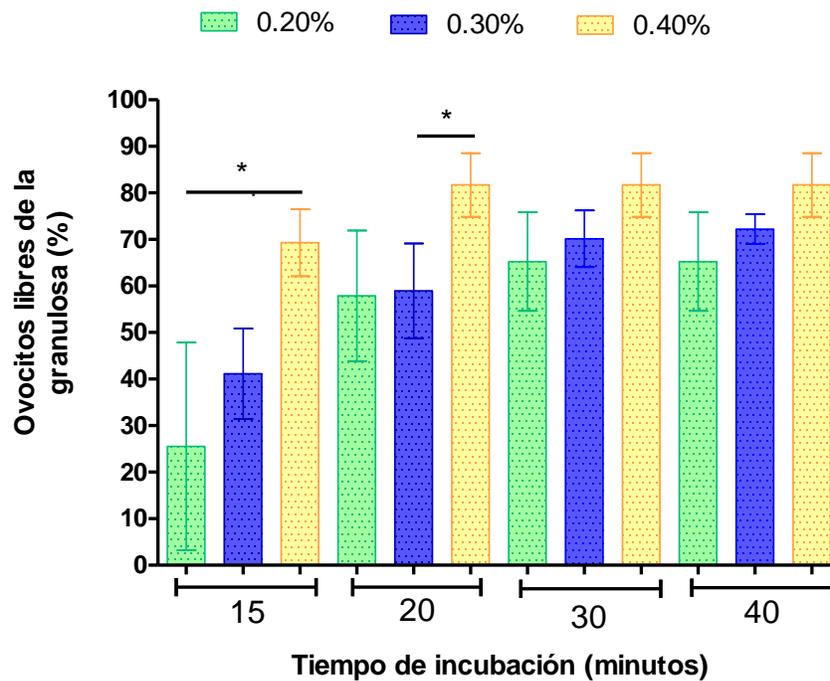


Figura 8. Porcentaje de ovocitos sin células de la granulosa a distintas concentraciones (verde 0.20%, azul 0.30% y amarillo 0.40%) y en diferentes tiempos (minutos). $P < 0.05$, n3, Anova post hoc tukey.

Posteriormente se llevó a cabo la eliminación de la zona pelúcida (Fig. 10), para ello se usó la solución ácida Tyrodes a 1X (pH 2.5) en tres temperaturas (36 °C, 38 °C y 40 °C) y en diferentes tiempos (5, 10 y 30 min). La temperatura óptima para la degradación de la zona pelúcida fue 40 °C en 5 min. En la figura 9 se observa un nivel de eficiencia del 95 % en 5 min., diferencia significativamente más alta ($P = < 0.05$) que con los otros tratamientos. Es importante señalar que la solución debe estar previamente a 40°C y los ovocitos deben incubarse a 40°C con la solución, además previo a la incubación se deben limpiar cuidadosamente los ovocitos asegurándose de no dejar restos celulares para que la solución ácida Tyrodes sea más eficiente. Además de no mejorar la eliminación de la zona pelúcida, los tiempos 10 y 30 min pueden dejar a los ovocitos frágiles.

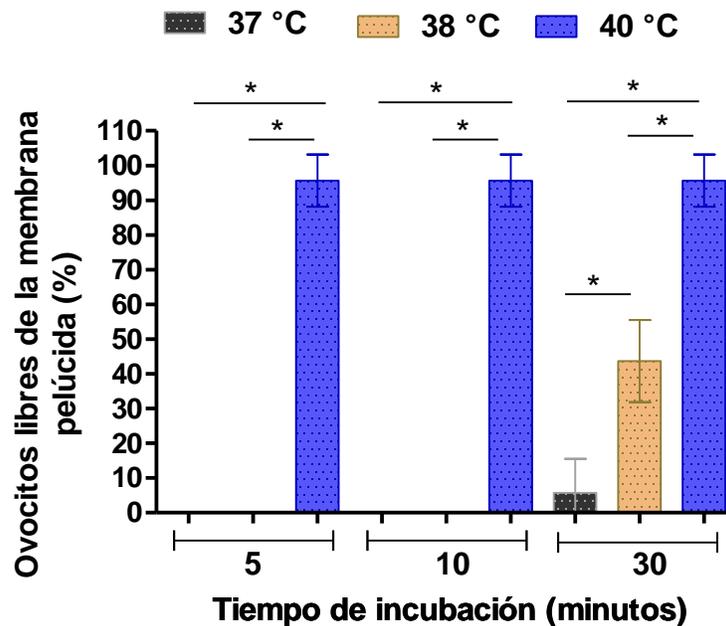


Figura 9. Porcentaje de ovocitos libres de la zona pelúcida en distintas temperaturas (Gris 37 °C, rosa 38 °C azul 40°C) y diferentes tiempos de incubación (minutos) para determinar que temperatura y tiempo eliminaban mejor la zona pelúcida. $P = < 0.05$, n3, Anova post hoc tukey.

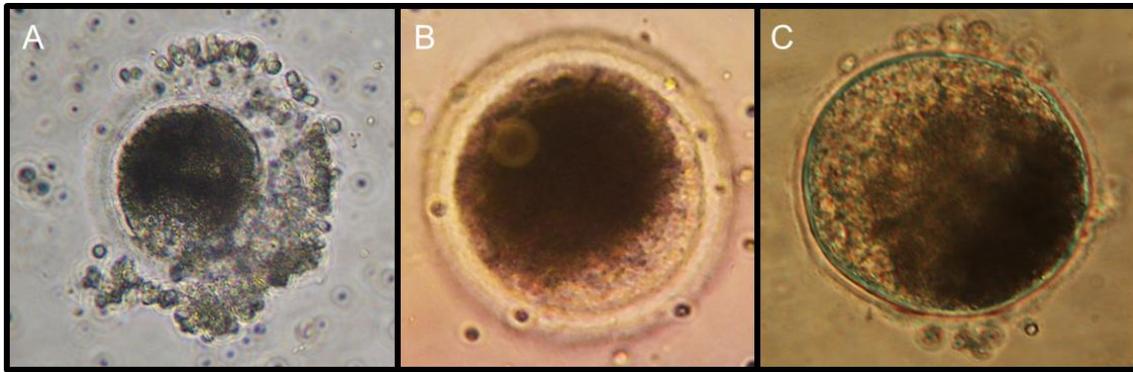


Figura 10. Proceso de degradación de las membranas que recubren al ovocito. A) Ovocito la zona de granulosa y pelúcida B) ovocito libre de la zona de la granulosa, la cual fue eliminada utilizando hialuronidasa. C) Ovocito libre de la zona pelúcida la cual fue eliminada utilizando Solución Ácida Tyrodes.

9.3. Biopanning *in vitro* en ovocitos

De los cinco experimentos independientes llevados a cabo con tres rondas de selección cada uno, se utilizaron los experimentos 1 y 2 (*) en la tercera ronda de selección para realizar la clonación del bacteriofago (Tabla 1), estos fueron seleccionados por exhibir un 100% de clones virales de color azul a diferencias de los otros experimentos que mostraron placas azules e incoloras, en la prueba de plaqueo con IPTG y X-GAL (figura 11).

Experimentos	Rondas de selección		
	1	2	3
1*	15	18	19
2*	20	16	20
3	15	17	18
4	20	16	18
5	17	18	20

Tabla 1. Número de experimentos y rondas de selección realizadas. Se usaron entre 15 y 20 ovocitos para cada experimento. (*) Indica de cuales experimentos se realizó el corte de clones (14 clones), todas ellas de la tercera ronda de selección.



Figura 11. Plaqueo de la tercera ronda de selección con IPTG y X-GAL.

9.4. Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia celular

Para corroborar la funcionalidad de los anticuerpos; conejo anti M13 obtenido en laboratorio CMEB-UMSNH y cabra anti- conejo de la compañía Santa Cruz conjugado a AP, se realizó un dot blot, utilizando los anticuerpos en papel de nitrocelulosa. Esta técnica permitió determinar la capacidad de unión del anticuerpo secundario cabra anti-conejo-AP al anticuerpo primario conejo anti M13. La figura 12 muestra los resultados, al tiempo 0 (antes del revelado), 1, 2 y 3 min después del revelado con fosfatasa alcalina (AP). La tira de papel “Neg” corresponde al control negativo, esta fue tratada solo con el anticuerpo primario de conejo anti-M13 y la tira “pos” (positiva) fue tratada con los dos anticuerpos, ambas tiras fueron reveladas con AP. Al tiempo cero podemos observar las dos tiras de papel totalmente incoloras, al minuto se observa como la tira “pos” tratada con los dos anticuerpos comienza a cambiar de color y para el minuto dos se pueden observar el revelado de color morado y finalmente en el minuto tres el revelado es aún más intenso, de esta manera se confirma que los anticuerpos se unen sin problema alguno entre sí y por lo tanto se pudo realizar la inmunocitoquímica.

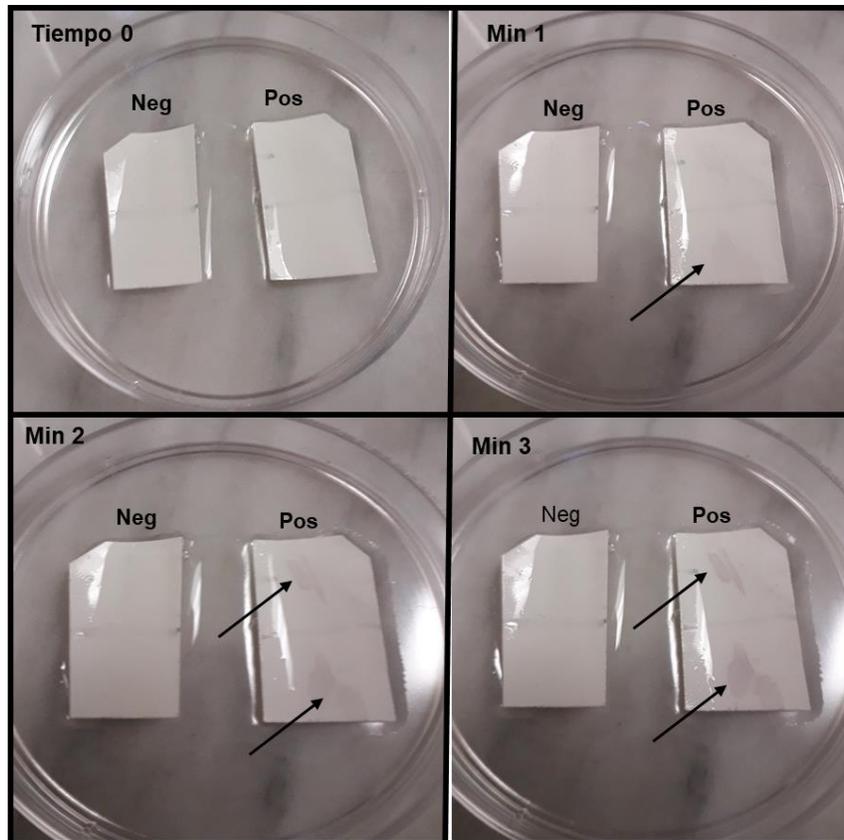


Figura 12. Detección del fago M-13 a través del método de dot blot en papel de nitrocelulosa. Las fotografías muestran el proceso del revelado con fosfatasa alcalina (AP). Tiempo 0, 1, 2 y 3 min corresponden al tiempo que tardó en realizarse el revelado. “**Neg**” papel de nitrocelulosa tratado con el bacteriófago M13 pero sin los anticuerpos. “**Pos**” papel de nitrocelulosa tratado con el bacteriófago M13 y el anticuerpo primario conejo-anti-M13 y el secundario Cabra-anti- conejo. Las flechas indican la posición de la marca violeta de la unión del antígeno con el anticuerpo.

La inmunocistoquímica no permitió detectar el bacteriófago M13 dentro del ovocito. Se analizaron los ovocitos en tiempo cero y después de hacer el revelado con AP en los tiempos 3, 5 y 10 min., a diferencia del dot blot en el cual se revisaron los tiempos 1, 2 y 3 min. Debido a que la coloración natural de los ovocitos es muy similar a la de la tinción que provoca el revelado con AP, no podemos asegurar que el bacteriófago se encuentre dentro de lo ovocitos (Fig. 13), esto nos llevó a realizar una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo (ratón anti-conejo IgG-FITC) para observar claramente los resultados.

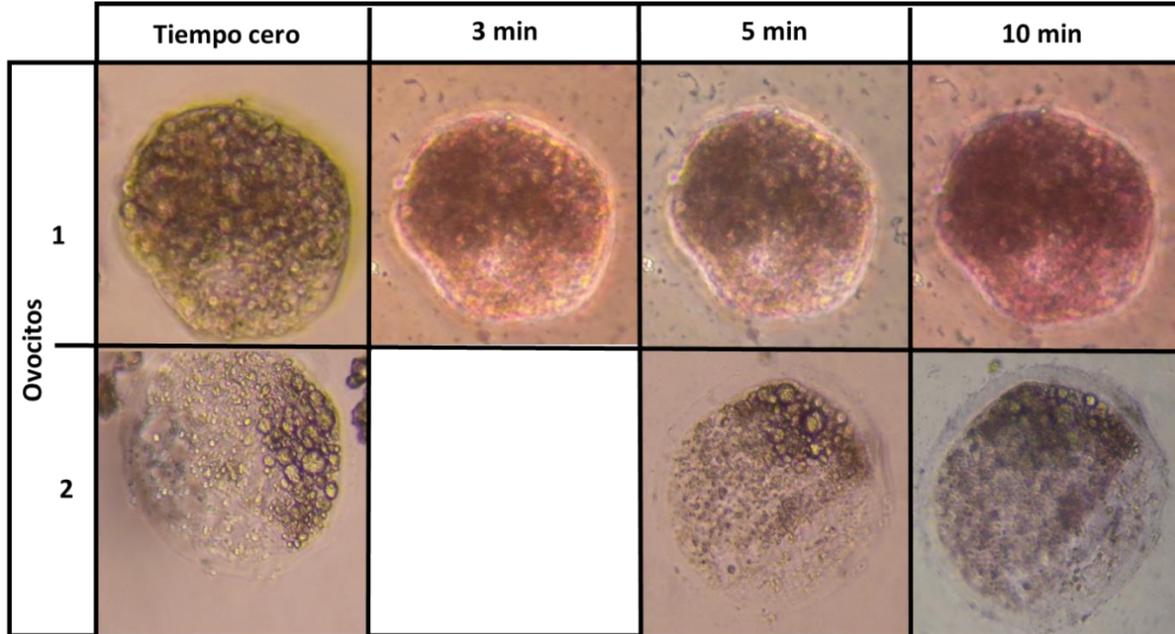


Figura 13. Inmunocitoquímica de ovocitos. Se muestra el resultado en dos ovocitos a distintos tiempos. En ninguna de las dos muestras se logran ver cambios significativos que nos indiquen la presencia del bacteriófago en el interior del ovocito.

Las 14 clonas aisladas se separaron en dos grupos (clonas 1-7 y 8-14) y se sometieron por grupo a inmunofluorescencia. Los dos grupos presentaron fluorescencia y se procedió a someter las clonas en individual a la inmunofluorescencia. Del grupo 1 (clonas 1-7) las clonas 1, 2, 4 y 5 presentaron fluorescencia en las 3 réplicas en el 100% de los ovocitos y del grupo 2 de manera individual no se presentó fluorescencia en ninguna clona (Fig.14).

Se utilizaron tres controles negativos: el bacteriófago M13, la biblioteca viral Phage Display y el anticuerpo secundario (Fig.14); el bacteriófago M13 al no presentar en su genoma la biblioteca de CPP no puede translocarse en lo ovocitos de cerdo ya que es específico para células bacterianas, la biblioteca viral Phage Display al no estar enriquecida con el bacteriófago de interés es casi improbable que alguno logre cruzar la membrana y finalmente al no tener el anticuerpo primario al cual acoplarse el secundario este no puede ser positivo (fig. 14).

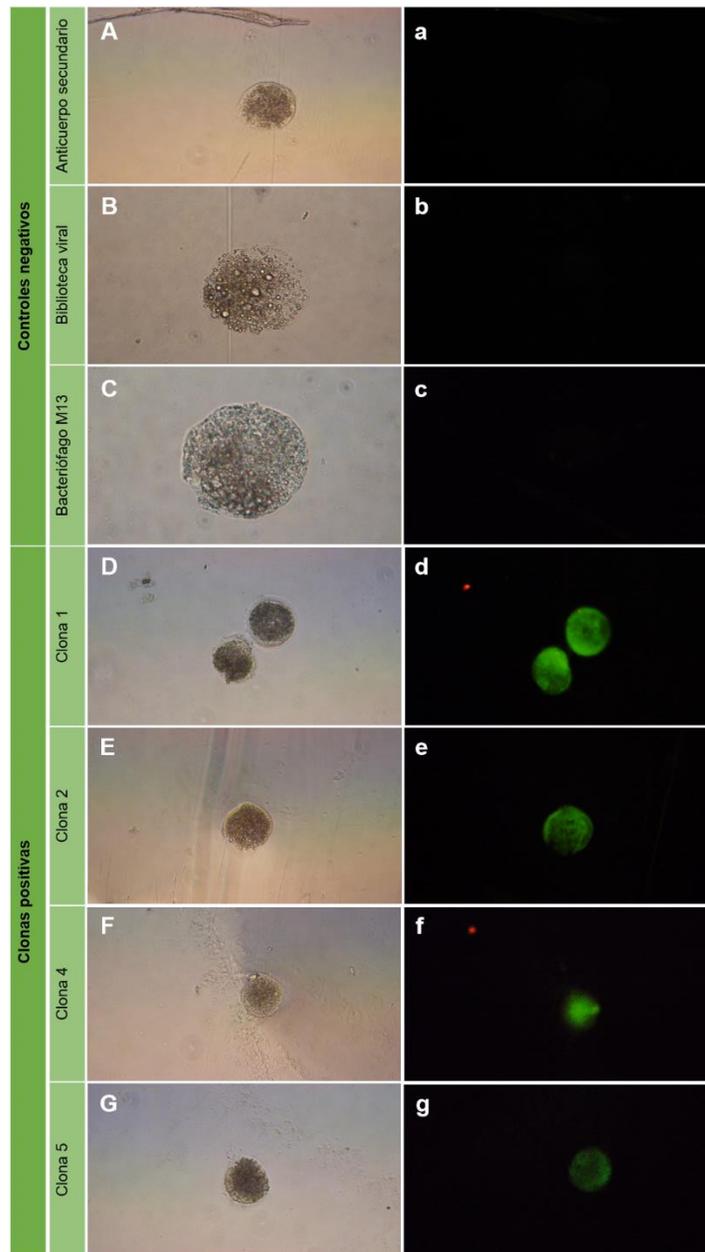


Figura 14. Inmunofluorescencia de ovocitos de cerdo. A, B, C y D corresponden a fotografías tomadas en microscopio de contraste de fases. a, b, c y d) corresponden a fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia. A y a) Control negativo con solo en anticuerpo secundario ratón anti-conejo IgG-FITC. B y b) control negativo con la biblioteca viral (12 aa 10^9 combinaciones). C y c) Control negativo utilizando el bacteriófago M13. D y d) Clona 1 de 14 positiva. E y e) Clona 2 de 14 positiva. F y f) Clona 4 de 14 positiva. G y g) Clona 5 de 14 positiva.

9.5. Extracción de ADN viral

La extracción de material genético se realizó a partir de la amplificación de las clonas. Una vez extraído el ADN viral se realizó una electroforesis para verificar su integridad. La figura 15, muestra el gel de agarosa con el marcador de peso molecular (MP) en la primer banda, las siguientes cinco bandas muestran el ADN de las clonas 1-5 y la última banda representa el control positivo, el cual corresponde al ADN de la biblioteca viral (PHD). Se pueden observar bandas íntegras y correspondientes al peso molecular del ADN viral del bacteriófago M13. Este experimento demuestra la presencia del fago M-13 dentro ovocitos expuestos a la biblioteca viral.

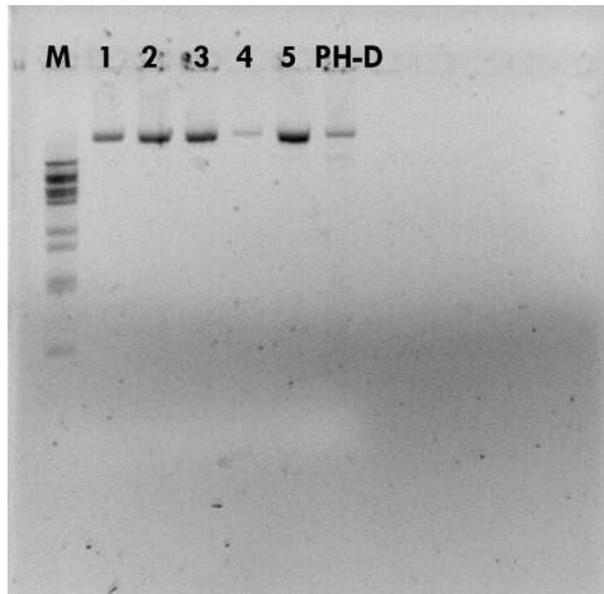


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa. **M)** marcador de peso molecular. **1, 2, 3, 4 y 5)** ADN íntegro de las clonas 1 - 5, **PH-D)** Control positivo, corresponde al ADN extraído de la biblioteca original usada.

10. DISCUSIÓN

En los ovocitos las membranas de la granulosa y zona pelúcida son una barrera de protección contra agentes externos además presentan funciones metabólicas de interés para el ovocito. La granulosa es importante para el aporte de nutrientes, la producción de hormonas sexuales, la participación en el paro meiótico y la maduración del ovocito (Su *et al.*, 2009). La zona pelúcida rodea al ovocito y al embrión temprano, está formada por glucoproteínas específicas para cada especie (Hoodbhoy *et al.*, 2005), juegan un papel importante en la fecundación, permitiendo la conexión de las células foliculares con el ovocito para dar paso a la foliculogénesis, ayuda a prevenir la polispermia, previene la implantación prematura del embrión, lo protege contra el estrés mecánico durante su transporte al útero (Wassarman *et al.*, 1999) y presenta una barrera biológica para la fecundación entre especies diferentes (Hoodbhoy *et al.*, 2005).

La lisis de dichas capas es importante en procesos de fertilización asistida, la eliminación de la granulosa permite observar la morfología del ovocito, para determinar que este se encuentre en buenas condiciones y poder clasificarlo de acuerdo a su estado de maduración (Moura *et al.*, 2017), mientras que la lisis de la zona pelúcida optimiza la eclosión del blastocisto expandido, puesto que se ha reportado que la manipulación del ovocito puede ocasionar endurecimiento anormal de la membrana (Tucker *et al.*, 1993), Asimismo se ha mostrado en eclosión asistida que puede mejorar la tasa de implantación (Mansour *et al.*, 2000); para el presente trabajo eliminar estas capas facilitó la translocación de los CPP en el ovocito, puesto que no presentan las enzimas (hialuronidasa, acrosina y tripsina) necesarias para cruzar a través las membranas.

Para la eliminación de la capa de la granulosa en ovocitos de cerdo se utilizaron tres concentraciones (0.2%, 0.3% y 0.4%) de hialuronidasa en distintos tiempos (15, 20, 30 y 40 min) a 37 °C, esto se llevó a cabo tomando en cuenta que la hialuronidasa de bovino funciona a 37 °C, sin embargo, las concentraciones y los tiempos usados varían en diferentes experimentos, se reporta que la concentración de 80 UI/ml es estándar para humanos, (Joris *et al.*, 1998), en

especies como el ratón se han probado 0.1% en 1, 5, 10 y 30 min encontrando que entre 10 y 30 min se elimina la granulosa (Ishizuka *et al.*, 2014) así mismo, se ha reportado una concentración de 40 U/ml (Gordon y Talansky, 1986).

En el procedimiento para la hidrolisis de la zona pelúcida se tiene reportado que una gota de 1 ml previamente caliente (36°C) de Solución Ácida Tyrodes (pH 2.5) elimina la membrana en un intervalo de 30 seg a 2 min. (Yano *et al.*, 2007; Jannaman y Hansen, 2018). Dichas condiciones no nos favorecieron, por ello se examinó la solución ácida Tyrodes a 1X (pH 2.5) en tres temperaturas (36 °C, 38 °C y 40 °C) para confirmar si la eficiencia nula de la solución en los ovocitos de cerdo se debía a la temperatura (36°C), asimismo se revisó la degradación de la membrana en diferentes tiempos, para encontrar el tiempo y temperatura óptimas y evitar daños en el ovocito, encontrando que la temperatura juega un papel importante para la degradación de la zona pelúcida puesto que solo la temperatura de 40 °C dio resultados favorables en su degradación.

El biopanning tiene como objetivo enriquecer los clones de fagos con afinidad de unión a un blanco a partir de rondas de selección. (Pande *et al.*, 2010; Phage display libraries, 2017). La biblioteca usada para el presente estudio se obtuvo a partir de la clonación de una diversidad de variantes del péptido y cada fago lleva en su genoma solo una variante (Phage display libraries, 2017). El ovocito al ser una célula eucariota no puede ser infectado por el bacteriófago de la biblioteca, puesto que es específico para células procariotas y la única manera de introducirse en el ovocito es a través de la secuencia peptídica que lleva clonada. De esta manera al incubar la biblioteca de fagos con los ovocitos de cerdo obtuvimos clonas con variantes específicas para la translocación en el ovocito.

Para comprobar que el bacteriófago M13 se introdujera en el ovocito y al mismo tiempo amplificara las secuencias peptídicas se realizó un plaqueo viral con IPTG y X-Gal, como el bacteriófago M13 es lisogénico, al incubarlo con *E. coli*, este introduce su ADN (el cual lleva el gen *lacZ α* y las variantes peptídicas) en la bacteria para que se incorpore en su genoma y se replique obteniendo de esta

manera una población bacteriana con gen $lacZ\alpha$ y al mismo tiempo se enriquecen las variante peptídica que fueron capaces de translocarse en el ovocito. La función del IPTG y el X-Gal fue revelarnos si en cada ronda de selección llevada a cabo se encontraban bacteriófagos. Esto se debe a que el IPTG al estar en contacto con el gen $lacZ\alpha$ promueve la expresión del promotor $lacZ\alpha$ obteniendo la enzima β -galactosidasa la cual hidroliza X-GAL a 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol que se dimeriza espontáneamente en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un pigmento azul que muestran las clonas en el plaqueo (Zhang, 2016). Por ello para nuestro estudio el revelado de clonas de color azul nos indicó que al menos una variante peptídica resultó ser positiva para la translocación en el ovocito de cerdo.

Posteriormente se cortaron 14 clonas de los biopanning uno y dos en su tercer ronda de selección, se eligieron estos primeros experimentos porque los otros tres mostraron placas mezcladas (azules e incoloras), en la prueba de plaqueo con IPTG y X-Gal y de acuerdo al Phage display libraries (2017), estas variaciones pueden ser por la contaminación con el fago de tipo salvaje, puesto que el fago salvaje no contiene el gen $LacZ\alpha$ que la biblioteca presenta. Las clonas seleccionadas se amplificaron en *E. coli* y se incubaron con ovocitos para realizar las pruebas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia y corroborar que los CPP lograron translocar al fago dentro del ovocito y no se quedaron unidos a la membrana.

Para comprobar la translocación de la o las variantes peptídicas de la biblioteca viral M13 primero se realizó la prueba de Inmunocitoquímica, sin embargo, esta prueba no permitió determinar con claridad la existencia de la o las variantes peptídicas dentro del ovocito, por ello se realizó la prueba de inmunofluorescencia con un anticuerpo secundario marcado con FITC, esta prueba se llevó a cabo porque ha demostrado ser una herramienta eficaz para el estudio de agentes etiológicos en tejidos y células, pues permite la detección de antígenos a través del uso de anticuerpos específicos y marcados que se unen al epítipo del antígeno (región Fc de los anticuerpos), generando una imagen visible a través del microscopio de fluorescencia como lo han demostrado estudios previos con el uso

de otros marcadores apifluorescentes unidos a CPP conocidos (Odell y Cook, 2013; Kwon *et al.*, 2013).

Por ejemplo, la rodamina B (RhoB) unida al CPP crotamina, ha sido un marcador eficiente en la translocación en embriones de bovino partenogénicos (PA) y fertilización in vitro (FIV) (Campelo *et al.*, 2016). También tenemos el uso de la proteína verde fluorescente (EGFP) unida a CPP LDP12 con la finalidad de observar si el CPP era capaz de introducirse en ovocitos de ratón y en embriones preimplantados, encontrando una Translocación eficiente en blastocistos de ratón, pero no en ovocitos y embriones preimplantados de dos células o mórula (Kwon *et al.*, 2013.)

Finalmente, la electroforesis de las clonas positivas termina por comprobar la integridad del ADN de bacteriófago M13, que conforma la biblioteca viral y la existencia de una a cuatro variantes peptídicas capaces de translocarse en el ovocito desnudo de cerdo. Hasta el momento solo sabemos que la biblioteca, Phage Display libraries del New England Bio. Labs. de 12 aminoácidos con 10^9 combinaciones cuenta con variantes peptídicas capaces de translocarse en el ovocito de cerdo desnudo, sin embargo, aún falta secuenciar estas variantes peptídicas. Entre otras investigaciones, falta determinar: qué moléculas pueden ser unidas y si estas son efectivas ya que en otras investigaciones se ha reportado que el CPP puede ser eficiente en la translocación de manera individual pero no unido a una carga, como el CPP crotamina que es capaz de translocarse de manera individual pero no unido a ADN (Campelo *et al.*, 2016).

La importancia de contar con CPP capaces de translocarse y acarrear genes en los ovocitos de cerdo radica en varias áreas como: la ganadería, para obtener animales con mayor cantidad de carne y, obtener cepas de cerdos que sean resistentes a enfermedades específicas, reducir las pérdidas embrionarias y criar animales con menor costo económico y en la biomedicina, en la producción de órganos para xenotrasplantes de cerdo a humano, en la producción de productos recombinantes para uso biomédico o nutracéutico, así como generar modelos de enfermedades humanas para la investigación médica y el desarrollo de fármacos

(Böhmová *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2011). El presente trabajo, proporciona un avance significativo en la búsqueda de CPP específicos para la modificación del genoma del cerdo.

11. CONCLUSIÓN

Hasta donde sabemos este es el primer trabajo que se lleva a cabo con la biblioteca Ph-D Phage display de 12 aminoácidos con 10^9 combinaciones para encontrar variantes peptídicas capaces de translocarse en el ovocito desnudo de cerdo Concluyendo así que, la biblioteca Phage display contiene péptidos capaces de translocarse en la membrana del ovocito de cerdo ya que de las 14 clonas aisladas cuatro dieron positivo a la prueba de Inmunofluorescencia.

12. PERSPECTIVAS

La presente investigación demuestra que la biblioteca Phage Display de 12 aa con 10^9 contiene péptidos capaces de translocarse en el ovocito de cerdo, sin embargo es necesario:

- Llevar a cabo la secuenciación de las clonas positivas, para obtener la secuencia consenso del o los aptámeros peptídicos penetrantes para poder realizar su síntesis y poder usarlo en experimentos de transferencia de genes.
- sintetizar el o los péptidos.
- Identificar tipos de moléculas cargo que pueden ser unidas al o los péptidos.
- Realizar estudios de toxicidad celular.
- Analizar el método por el cual se translocan en el ovocito de cerdo.

13. ANEXOS

Medio de cultivo Luria Bertani (LB)

A 950 ml de H₂O destilada adicionar:

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g

- Verter todos los reactivos en el agua destilada y agitar hasta disolver.
- Ajustar pH 7 ± 0.2 (con NaOH 5N).
- Aforar a 1 litro con H₂O destilada.
- Esterilizar por 30 min.

NOTA: Se almacena a temperatura ambiente y una vez abierto se almacena en refrigeración de 2 a 8 °C.

Medio de cultivo Luria Bertani Agar

A 1 litro de luria adicionar:

- 14 g de Bacto agar.
- Esterilizar por 30 min.
- Esperar a enfrié y adicionar 1 µl de tetraciclina a 20 µl/ml por cada 1 ml de luria.

Medio top agar

A 250 ml de luria adicionar:

- 1.75 g agarosa grado biología molecular, para obtener una concentración de 0.7%.
- Esterilizar por 30 min.
Esperar a enfrié y adicionar 1 µl de tetraciclina a 20 µl/ml por cada 1 ml de luria

Buffer de fosfato salino (PBS)

Preparación para 1 litro

137 mM NaCl	8 g	Cloruro de Sodio
2.7 mM KCl	0.2 g	Cloruro de Potasio
10 mM Na ₂ HPO ₄	1.44 g	Fosfato de Sodio bibásico
2 mM KH ₂ PO ₄	0.24 g	Fosfato de Potasio monobásico

- Disolver todas las sales en 900 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 litro.
- Filtrar y esterilizar 20 min a 15 psi.

Hialuronidasa

A 5 ml de agua destilada adicionar:

- 0.02g de hialuronidasa para obtener una concentración de 0.40%.
- Esterilizar por 30 min.
- Esperar a enfrié y guardar a -20°C.

PEG 8000 20% / NaCl 2.5 M

En 10 ml de agua destilada mezclar

- 1 gr de PEG 8000 y 0.730 g NaCl
- Esterilizar 15 min.
- Mezclar bien, mientras aún está caliente y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de yoduro

A 10 ml de agua destilada adicionar:

- Tris-HCl (pH8.0) 10 mM 0.1 ml
- EDTA 1Mm 0.0029 g
- Yoduros de sodio (NaI) 4M 5.995 g

Preparación de buffer de corrida (TBE) a10X

Para 1 litro:

Tris base	108 g	90 mM
Ácido bórico	55 mg	90 mM
0.5 M EDTA (Ph 8)	40 ml	90 mM
Agua	1 000 ml	

Para preparar el buffer a 2X adicionar a 1L de TEB 10X 5 litros de agua

Preparación de buffer de corrida (TBE) a 0.5%

Para 1 litro:

750 ml de agua destilada

250 ml de TBE a 2X

Mesclar el agua destilada con el TBE a 2X verter a la caja de electroforesis y adicionar 5ul de bromuro de etidio

Gel de agarosa a 0.8%

Mezclar:

- Buffer TAE 1X 200 ml
- Agarosa 1.6 g

Calentar para disolver el agarosa.

Tetraciclina 20 mg/ml

Mezclar:

- Tetraciclina en polvo 300 mg
- Etanol 70% 15 ml

Mantenerla en refrigeración y a aislarla de la luz.

Tripsina al 0.25%

Mezclar en 100 ml de agua destilada 0.25 g de Tripsina

14. REFERENCIAS

- Aigner, B., Simone R., Barbara K., Nikolai K., Mayuko K., Annegret W. y Eckhard W. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 88: 653-64. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0610-9>.
- BioRender. (2020). Recuperado 24 de enero de 2020, de <https://biorender.com/> website: <https://app.biorender.com/gallery/illustrations>.
- Bogliotti, Y., Vilarino, M., y Ross, P. (2016). Laser-assisted Cytoplasmic Microinjection in Livestock Zygotes. *Journal of visualized experiments: Jove*, (116), 54465. doi.10.3791/54465.
- Campelo, S., Canel, N., Bevacqua, R., Melo, M., Rádis-Baptista, G., Freitas, V. y Salamone, D. (2016). Crotamine, a cell-penetrating peptide, is able to translocate parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos but does not improve exogenous DNA expression. *J Assist Reprod Genet*. 33: 1405. Doi: 10.1007/s10815-016-0772-7.
- Cao, B., Yang, M., & Mao, C. (2016). Phage as a Genetically Modifiable Supramacromolecule in Chemistry, Materials and Medicine. *Accounts of chemical research*, 49(6), 1111–1120. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00557>.
- Chung, W. J., Lee, D. Y., & Yoo, S. Y. (2014). Chemical modulation of M13 bacteriophage and its functional opportunities for nanomedicine. *International journal of nanomedicine*, 9, 5825–5836. <https://doi.org/10.2147/IJN.S73883>.
- Desjobert, C., Soultrait, V., Aurelie, V., Vincent, P., Simon, L., Laura T-G. y Michel, F. (2004). Identification by phage display selection of a short peptide able to inhibit only the strand transfer reaction catalyzed by human immunodeficiency virus type 1 Integrase. *Biochemistry*, 43 (41): 13097-105. <https://doi.org/10.1021/bi049385e>.
- El-Andaloussi, S., Järver, P., Johansson, H. y Langel, Ü. (2007). Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochemical Journal*. 407 (2): 285–292. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20070507>.

- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppé, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F. y Giacca, M. (2003). Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins. *The journal of biological chemistry*, 278(36), 34141–34149.
- Gagat, M., Zielińska, W. y Grzanka, A., (2017). Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 40 (6), 1615-1623. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.317>.
- Grage, S. L., Afonin, S., Kara, S., Buth, G., & Ulrich, A. S. (2016). Membrane Thinning and Thickening Induced by Membrane-Active Amphipathic Peptides. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 65. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00065>.
- Guo, Z., Peng, H., Kang, J., y Sun, D. (2016). Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomedical reports*, 4(5), 528–534. <https://doi.org/10.3892/br.2016.639>
- Hoodbhoy, T., Joshi, S., Boja, E. S., Williams, S. A., Stanley, P., y Dean, J. (2005). Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*, 280(13), 12721–12731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413569200>.
- Ishizuka, Y., Takeo, T., Nakao, S., Yoshimoto, H., Hirose, Y., Sakai, Y., Horikoshi, Y., Takeuji, S., Tsuchiyama, S., y Nakagata, N. (2014). Prolonged exposure to hyaluronidase decreases the fertilization and development rates of fresh and cryopreserved mouse oocytes. *The Journal of reproduction and development*, 60(6), 454–459. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-045>
- Jannaman, E. y Hansen, P. J. (2018). Zona pellucida removal using acid tyrode's solution and snap freezing. University of Florida. *Animal Science*.
- Jones, S., Lukanowska, M., Suhorutsenko, J., Oxenham, S., Barratt, C., Publicover, S., Copolovici, D. M., Langel, Ü., y Howl, J. (2013). Intracellular translocation and differential accumulation of cell-penetrating peptides in bovine spermatozoa: evaluation of efficient delivery vectors that do not compromise human sperm

motility. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(7), 1874–1889.
<https://doi.org/10.1093/humrep/det064>.

Koren E. y Torchilin V. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends in Molecular Medicine*. 18 (7): 385-93.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.012>.

Kwon, S., Kwak, A., Shin, H., Choi, S., Kim, S. y Lim, H. (2013). Application of a novel cell-permeable peptide-driven protein delivery in mouse blastocysts. *Reproduction*. Vol. 146 (2): 145-153. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0203>.

Lavitrano, M., Bacci, M. L., Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C., Fioretti, D., Giancotti, P., Marfé, G., Pucci, L., Renzi, L., Wang, H., Stoppacciaro, A., Stassi, G., Sargiacomo, M., Sinibaldi, P., Turchi, V., Giovannoni, R., Della Casa, G., Seren, E., y Rossi, G. (2002). Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14230–14235.
<https://doi.org/10.1073/pnas.222550299>.

Lee, M. T., Hung, W. C., Chen, F. Y., y Huang, H. W. (2005). Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation. *Biophysical journal*, 89(6), 4006–4016.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.068080>.

Liu, W., Wu, L. H., Yue, M., Nashun, B., Tang, H., Chen, Y., Chen, B. Z., Yuan, J., Xiao, D., y Gu, W. W. (2017). Generation of DKK1 transgenic Tibet minipigs by somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Oncotarget*, 8(43), 74331–74339.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20604>.

Luo, Y., Lin, L., Bolund, T. Jensen, C., Sørensen B. (2012). Genetically modified pigs for biomedical research. *J Inherit Metab Dis*. 35, 695–713.
<https://doi.org/10.1007/s10545-012-9475-0>.

- Mansour, R. T., Rhodes, C. A., Aboulghar, M. A., Serour, G. I., & Kamal, A. (2000). Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(5), 1061–1064. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.5.1061>.
- Moses Phyllis B. 1987. *Biotechnology in Agriculture. Agricultural Biotechnology: Strategies for National Competitiveness*. Washington (DC): National Academy Press (US).tercera edición. 149-150.
- Moura, B. R., Gurgel, M. C., Machado, S. P., Marques, P. A., Rolim, J. R., Lima, M. C., y Salgueiro, L. L. (2017). Low concentration of hyaluronidase for oocyte denudation can improve fertilization rates and embryo quality. *JBRA assisted reproduction*, 21(1), 27–30. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170008>.
- Pande, J., Szewczyk, M. M., y Grover, A. K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology advances*, 28(6), 849–858. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>.
- Pease, S. y Lois, C. (2006). *Mammalian and avian transgenesis new approaches*. California, USA. Springe. 1-3.
- Petrie A. y Watson P. (2013). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. UK, West Sussex, Oxford. Wiley-Blackwell. Tercera edición. 105-109.
- New Englan Biolabs. (2017). *Protein Tools. Ph.D.TM Phage display libraries*. New England Bio Labs inc. Versión 2.1, 1-40.
- Roger K., (2018). Horizontal gene transfer. *Encyclopaedia Britannica, inc.* <https://www.britannica.com/science/horizontal-gene-transfer>. Último acceso 01 julio 2019.
- Saar, K., Lindgren, M., Hansen, M., Eiríksdóttir, E., Jiang, Y., Rosenthal-Aizman, K., Sassian, M., y Langel, U. (2005). Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. *Analytical biochemistry*, 345(1), 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.07.033>

- ScienceDaily. (2019). Recuperado 27 de julio de 2019, de <https://www.sciencedaily.com/> website: https://www.sciencedaily.com/terms/somatic_cell_nuclear_transfer.htm.
- Sieber, K. B., Bromley, R. E., y Dunning Hotopp, J. C. (2017). Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes. *Experimental cell research*, 358(2), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.009>.
- Su, Y. Q., Sugiura, K., y Eppig, J. J. (2009). Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in reproductive medicine*, 27(1), 32–42. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1108008>.
- Tucker, M. J., Luecke, N. M., Wiker, S. R., y Wright, G. (1993). Chemical removal of the outside of the zona pellucida of day 3 human embryos has no impact on implantation rate. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 10(3), 187–191. <https://doi.org/10.1007/bf01239219>.
- Valkna A., U. Soomets y Ü. Langel. (2002). Cell-penetrating peptides processes and application. Boca Raton, New York Washington, D.C. Pp 347- 358.
- Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., y Williams, Z. (1999). Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *The Journal of experimental zoology*, 285(3), 251–258.
- White, M., Whittaker, R., Gándara, C., y Stoll, E. A. (2017). A Guide to Approaching Regulatory Considerations for Lentiviral-Mediated Gene Therapies. *Human gene therapy methods*, 28(4), 163–176. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.096>
- Yano, K., Yano, C., Kubo, T., Ohashi, I., Maeda, N., y Fukaya, T. (2007). Chemical zona pellucida thinning with acidified Tyrode's solution: comparison between partial and circumferential techniques. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 24(10), 471–475. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9131-z>
- Yin, Y., Hao, H., Xu, X., Shen, L., Wu, W., Zhang, J., y Li, Q. (2019). Generation of an MC3R knock-out pig by CRSPR/Cas9 combined with somatic cell nuclear transfer

(SCNT) technology. *Lipids in health and disease*, 18(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1073-9>.

Zhang Y. S. (2016). Blue-white screening liquid can eliminate false positives in blue-white colony screening. *Genetics and molecular research: GMR*, 15(2), 10.4238/gmr.15027925. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027925>.

Böhmová, E., Machová, D., Pechar, M., Pola, R., Gunár, K., Janouskova, O. y Etrych, T. (2018). Cell-Penetrating Peptides: a Useful Tool for the Delivery of Various Cargoes Into Cells. *Physiological research*. 67. S267-S279. [10.33549/physiolres.933975](https://doi.org/10.33549/physiolres.933975).

Mahadevan, M. M., y Trounson, A. O. (1985). Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 43(2), 263–267. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48383-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48383-4).

De Vos, A., Van Landuyt, L., Van Ranst, H., Vandermonde, A., D'Haese, V., Sterckx, J., Haentjens, P., Devroey, P., y Van der Elst, J. (2008). Randomized sibling-oocyte study using recombinant human hyaluronidase versus bovine-derived Sigma hyaluronidase in ICSI patients. *Human reproduction (Oxford, England)*, 23(8), 1815–1819. <https://doi.org/10.1093/humrep/den212>.

Studocu. (2020). Recuperado 3 de marzo de 2020, de <https://www.studocu.com/it/document/universita-politecnica-delle-marche/ingegneria-genetica/apuntes/7-m13/4040912/view>.

Joris, H., Nagy, Z., Van de Velde, H., De Vos, A., y Van Steirteghem, A. (1998). Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 1, 76–86. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.76.

Gordon, J. W., y Talansky, B. E. (1986). Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *The Journal of experimental zoology*, 239(3), 347–354. <https://doi.org/10.1002/jez.1402390306>.

Odell, I. D., y Cook, D. (2013). Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology*. 133 doi:10.1038/jid.2012.455.

Deng, W., Yang, D., Zhao, B., Ouyang, Z., Song, J., Fan, N., Liu, Zhaoming, Zhao, Y., Wu, Q., Nashun, B., Tang, J., Wu, Z., Gu, W. y Lai, L. (2011). Use of the 2A Peptide for Generation of Multi-Transgenic Pigs through a Single Round of Nuclear Transfer. *PLoS ONE* 6(5): e19986. doi:10.1371/journal.pone.0019986.