"Células donantes mesenquimales, agregación embrionaria y modulación de la expresión génica mediada por CRISPR/dCas9 para clonación bovina"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Lic. Virginia Savy

Lic. en Biotecnología y Biología Molecular - Universidad Nacional de La Plata Año 2012

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires





FAUBA Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires "Células donantes mesenquimales, agregación embrionaria y modulación de la expresión génica mediada por CRISPR/dCas9 para clonación bovina"

# **COMITÉ CONSEJERO**

Director de Tesis **Daniel Felipe Salamone** Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires) Master of Science (Universidad de Saskatchewan) Doctor en Biotecnología y Biomedicina (Universidad de Massachusetts)

Co-director de Tesis **Romina Jimena Bevacqua** Lic. en Biotecnología (Universidad Nacional de Quilmes) Doctora de la Universidad de Buenos Aires

## JURADO DE TESIS

JURADO

## Eugenia Mariela Roldán Olarte

Bioquímica (Universidad Nacional de Tucumán) Doctora en Bioquímica (Universidad Nacional de Tucumán)

## JURADO

## **Mariano Gabriel Buffone**

Licenciado en Bioquímica (Universidad de Buenos Aires) Doctor en Bioquímica (Universidad de Buenos Aires)

## JURADO

# **Pablo Daniel Cética**

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires) Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Fecha de defensa de la Tesis: 15 de Febrero de 2019

# Dedicatoria

A mi familia

## Agradecimientos

Esta Tesis es tan mía como de todos aquellos que me enseñaron, alentaron y acompañaron en estos 5 años. Es un gran rompecabezas y cada persona, una pieza fundamental e irremplazable a quien voy a estar eternamente agradecida.

En primer lugar quiero agradecer a mi director, el Dr. Daniel Salamone, quien me enseñó gran parte de lo que sé sobre embriología. Por ser un apasionado de la ciencia y transmitirlo, por compartir sus conocimientos, sus contactos y su viaje a Viet Nam. Por sus *piscos* en cada festejo. Por darme herramientas para perseguir mis sueños.

Este trabajo no hubiese sido lo mismo sin la ayuda de mi co-directora, la Dra. Romina Bevacqua, de quien no solo aprendí sobre ciencia sino sobre perseverancia, dedicación y humildad. A ella le agradezco infinitamente por creer en mí y hacerme parte de sus proyectos, por abrirme la puerta al fascinante mundo de la transgénesis, por su compañerismo en mis primeros pasos, esperándome con disposición hasta la madrugada. Porque aun a la distancia, mantuvo su 6<sup>to</sup> sentido alerta y me ayudo con infinita paciencia a organizar ensayos y escritura. Por ser un gran ejemplo y principalmente por ser una excelente amiga.

Al Dr. Rafael Fernández y Martín, quiero agradecerle por enseñarme todos los trucos de la biología molecular, pero sobre todo por la GRAN paciencia, por el compañerismo, por las tantas charlas de ciencia y de la vida. Por dedicarme muchísimo tiempo para ayudarme en las decisiones académicas y personales. Por confiar en mí, incluso cuando yo no estaba tan segura. Por sus cartas mágicas de recomendación.

A Naty, Gery y Vir, gracias por prestarme sus manos y neuronas para mis experimentos y por trabajar con el corazón. Por hacer que las tantas horas de trabajo vuelen, por los clones cumbieros, las cenas sin TACC, las noches de trabajo y la escapada cordobesa. Por hacer todo más sencillo y divertido. Por su amistad.

Lo mejor de este doctorado fue hacerlo en el LabBA y conocer a tanta gente brillante. A todos los integrantes (los que fueron, los que son y los que serán): Carli, Andrés, Belén, Marian, Cauchi, Euge, Matteo, Elena, Adri, Juli, Cami, Laura, Minee, Flor y Olin, gracias por la calidez humana y por generar un ambiente de compañerismo y amistad. Gracias por los mates, las cenas de la curva, los congresos, los almuerzos y las largas sobremesas al sol. Por compartir reactivos, horas y anécdotas. Por la garra guacha, por las tardes de tías con Felix y las clases de yoga. Gracias Olin por los muchos abrazos. Sin dudas me llevo amigos más que colegas.

A Normis y Patri, gracias por su rol de madre/tía. Por malcriarme con desayunos y comida rica. Por su enorme cariño. A Marito, por todos los mates y charlas de las tardes.

A todo CIDME - Universidad Maimónides, por adoptarme y tratarme siempre como una integrante más. Por confiar en mí como persona y profesional. Por darme libertad y seguridad al trabajar. A Lu, gracias por su amistad divertida y espontánea.

A todos los colaboradores de esta Tesis que, aún sin conocerme, me prestaron equipos, reactivos y tiempo de forma desinteresada. Por correr las piedras y hacer que esta gran rueda científica siga girando. En particular a la Dra. María Inés Gismondi, al Dr. Oscar Taboga y a sus respectivos grupos de INTA Castelar, por recibirme durante más de un año en sus laboratorios y ayudarme con mi proyecto; por el cariño y la confianza. Al Dr. Jason Knott y Katie Wilson, por recibirme en Michigan State University, por las enseñanzas y la experiencia y al Dr. Sandeep Rajput por ayudarme con las RTqPCR. Al Dr. Federico Pereyra Bonnet y a la Lic. Carla Giménez, por brindar toda su ayuda y apoyo en el mundo de CRISPR. A las Dras. Daniela Olea y Lucía Moro, por ayudarme con la caracterización de las células para el desarrollo de esta Tesis. A la Dra. Susana Rulli y sobre todo a la Dra. Laura Ratner por recibirme con una sonrisa en IByME y por permitirme trabajar con libertad. Este trabajo no hubiera sido posible sin su ayuda.

A las instituciones que permitieron el desarrollo de este trabajo de Tesis: la Universidad de Buenos Aires y en particular la Facultad de Agronomía, el Departamento de Producción Animal y la Escuela para Graduados "Ing. Agr. Alberto Soriano", gracias por la educación de calidad. A la Sra. Mabel Bressan, por desatar todos los nudos burocráticos. Gracias también a CONICET, Agencia, Universidad Maimónides y a la Comisión Fulbright, por confiar y financiar este proyecto.

No quiero dejar de agradecer a todos los voluntarios del Grupo Andando y Grupo el Ombú que, si bien no se involucraron directamente en esta Tesis, me ayudaron a tener los pies en la tierra y a ser comprometida. Gracias por ser tan nobles y hacer que cada sábado el mundo sea un poquito más justo.

A todos mis amigos, que para mi gran felicidad son muchos:

-A mis "*Guachis*": Agus, Pecu, Yuli, Fer, Eli, Negri, Car, Jime, Juli y Lu: ¡GRACIAS! (y en mayúscula). Por acompañarme en cada acierto y tropezón. Porque aun trabajando en áreas distintas supieron festejar conmigo hasta la síntesis del ARN. Por las cenas, los viajes, las salidas. Por alegrarme las semanas. Por ser un soporte inigualable en CABA/La Plata. Por hacerme sentir siempre en casa. Gracias Yuli por caminar codo a codo hace más de 10 años, también por los contrabados.

-A mis amigas de Darre, las de siempre y para siempre: Pao, May, Sasa, Anitta, Gordy y Naty, que fueron soporte aun a más de 600 km. Gracias por enseñarme que no hay distancia, ni tiempo, ni vida que nos separe. A Vane, mi concu, por sacar siempre mi mejor versión y creer en mí, por ser una referencia de perseverancia y optimismo, por ser mi gran "amuleto" de buenas energías.

-A mis amigos de la vida y de Exactas: Fabri, Nico, Kuakua, Damián, Furchi, Andrés, Jero, Mendo, Mati y Agus. A mis queridos "Chasiquenses" Toto, Fran, Bruno, Emi y Marcos. Gracias por los encuentros siempre alegres y cariñosos.

- A mi querida Laura, gracias por su cariño inmenso, a Dani W., Dani D. y a Niria, por sus palabras de aliento y alegría en cada encuentro.

A mi familia del corazón, los Miguel, gracias por tanto cariño y contención. En particular a Ani, Martín y Mateo, por formalizarme en los papeles como madrina de Simón.

A todos los Eizaguirre-Franco por el amor y el empuje. Por la contención ya sea en una palabra, un abrazo o un mate. Por ser mi familia.

A mi gran familia, los Pastuszuk y los Savy, quiero agradecerles el cariño eterno y el aliento constante. A los Darregueirenses, por organizar con tanto amor los "almuerzomeriendacena" que tan felíz me hacen. A los "pequeños": Sol, Juan y mi bello ahijado Simón, por estar siempre cerquita a través de cartas y videos. Y a los nuevos integrantes, Mati y Gon, por completar esta familia de forma perfecta.

No me va a alcanzar el tiempo para agradecerles a mis hermanas, Ju y Flor. Gracias por ser mi mejor espejo y bajarme a tierra. Gracias por creer en mí y soñar conmigo; por festejar mis logros y ahuyentar mis fantasmas. Por tener siempre la palabra justa, en el momento justo. Porque son el mejor ejemplo de humildad y profesionalismo. Por el amor sin límites y la confianza.

Sin lugar a dudas no hubiese llegado hasta acá sin la ayuda de mis papás, Omar y Lili. Gracias por ser ejemplo en todos los aspectos de la vida. Por alentarme a perseguir mis sueños, ayudarme a volar y acompañarme en el camino. Por enseñarme que con esfuerzo los sueños se cumplen. Su compañía hizo que todos los desafíos sean más sencillos y que todos los aciertos sean más felices. Gracias por todo el amor.

A Juan, gracias por tanto. Por ser de las personas más pacientes y nobles que conozco. Por el amor, el apoyo y principalmente por su optimismo en estos 5 años. Gracias por entenderme, aun en mi caos. Gracias por la buena cerveza y, sobre todo, por hacerme felíz.

A todos los que en estos 5 años formaron parte de mi vida: MUCHAS GRACIAS.

## Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Virginia Savy Lic. en Biotecnología y Biología Molecular Universidad Nacional de La Plata

#### Publicaciones derivadas de la Tesis

Bevacqua RJ, Fernandez-Martin R, Canel NG, Gibbons A, Texeira D, Lange F, Vans Landschoot G, **Savy V**, Briski O, Hiriart MI, Grueso E, Ivics Z, Taboga O, Kues WA, Ferraris S, Salamone DF. (2017). Assessing Tn5 and Sleeping Beauty for transpositional transgenesis by cytoplasmic injection into bovine and ovine zygotes. PLoS One. 16;12(3):e0174025. doi: 10.1371/journal.pone.0174025. eCollection 2017.

Bevacqua RJ, Fernandez-Martín R, **Savy V**, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Niemann H, Taboga OA, Ferraris S, Salamone DF. (2016). Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. Theriogenology 86(8):1886-1896.e1

Ana P. Alessio, Alejandro E. Fili, Wiebke Garrels, Diego O. Forcato, María F. Olmos Nicotra, Romina J. Bevacqua, **Virginia Savy**, María Inés Hiriart, Thirumala R. Talluri, Stefan Moisyadi, Jesse B. Owens, Zoltan Ivics, Daniel F. Salamone, Wilfried A. Kues and Pablo Bosch (2016). Establishment of cell-based transposon-mediated transgenesis in cattle. Theriogenology. 15;85(7):1297-311.e2.

# ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	iv
Declaración	vii
Publicaciones derivadas de la Tesis	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
Abreviaturas	xiv

Capí	tulo 1	: Introducción general	1
1.1.	Fisi	iología de la reproducción bovina y desarrollo embrionario preimplantatorio	3
1.1	.1	Fisiología reproductiva de la hembra bovina	3
	1.1.1.	l Oogénesis y desarrollo folicular	3
-	1.1.1.2	2 Maduración oocitaria, ondas foliculares y ovulación	6
1.1	.2	Fecundación y desarrollo embrionario preimplantatorio	8
1.1 dif	'.3 Terenci	Diferenciación celular durante el desarrollo embrionario preimplantatorio, expresió ial de genes	ón 10
1.2.	Bio	tecnologías reproductivas en el bovino	.16
1.2	2.1.	Clonación por trasplante nuclear de célula somática	.19
1.2	2.2.	Limitaciones de la técnica de SCNT	.21
1.3.	Cél	ulas madre	.23
1.3	8.1.	Células madre embrionarias	.24
1.3	8.2.	Células madre adultas	.25
1.4.	Ag	regación embrionaria	.28
1.5.	Sist	tema CRISPR/Cas9	.31
1.5	5.1.	Modulación de expresión génica mediada por CRISPR/dCas9	.33
1.6.	Pre	sentación del problema	.35
1.7.	Ob	jetivos	.36
1.7	.1.	Objetivo General	.36
1.7	.2.	Objetivos Específicos	.36
1.8.	Hip	oótesis de trabajo	.36

Capí	Capítulo 2: Aislamiento y caracterización de células mesenquimales bovinas de tejido adiposo 38		
2.1	Introducción	40	
2.2	Materiales y metodología	42	
2.3	Resultados	51	
2.4	Discusión	59	
2.5	Conclusiones	63	

Capítı clones	Capítulo 3: Uso de células mesenquimales y agregación embrionaria en la producción de clones bovinos		
3.1.	Introducción	67	
3.2.	Materiales y metodología	70	
3.3.	Resultados	77	
3.4.	Discusión	84	
3.5.	Conclusiones	87	

Capíta modu	ulo 4: Aplicación del Sistema CRISPR/dCas9-VP160 en embriones bovinos lación de la expresión de genes asociados a TE	<b>para la</b> 89
4.1.	Introducción	91
4.2.	Materiales y metodología	96
4.3.	Resultados	107
4.4.	Discusión	116
4.5.	Conclusiones	
Capít	ulo 5: Consideraciones generales	121

Bibliografía
--------------

# ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Efecto de la complementación celular en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos partenogenéticos	57
Cuadro 3.1. Oligonucleótidos empleados en RTqPCR de clones bovinos	76
<b>Cuadro 3.2.</b> Efecto del uso de ASC y agregación embrionaria en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos producidos por SCNT	81
Cuadro 4.1. Secuencias específicas $(N_{20})$ de los sgRNAs diseñados para bovino	99
<b>Cuadro 4.2.</b> Secuencias específicas (N <sub>20</sub> ) de los sgRNAs diseñados para murino	99
Cuadro 4.3. Anticuerpos empleados en ensayos de inmunodetección de dCas9- VP160	105
Cuadro 4.4. Oligonucleótidos empleados en ensayos de RTqPCR de embriones microinyectados	106
<b>Cuadro 4.5.</b> Desarrollo de embriones microinyectados dCas9_Cdx2A, dCas9_Cdx2B y dCas9_Cdx2Tot respecto de embriones FIV control	110
<b>Cuadro 4.6.</b> Desarrollo de embriones microinyectados dCas9_SM y dCas9_TF respecto de embriones FIV control	114

•

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de la foliculogénesis	5
Figura 1.2. Esquema del desarrollo preimplantatorio	8
Figura 1.3. Modelo resumido de regulación de la diferenciación mediada por HIPPO	12
Figura 1.4. Modelo de regulación de la diferenciación mediada por TFAP2C	14
Figura 1.5. Modelo de regulación del silenciamiento de <i>NANOG</i> mediado por SMARCA4.	15
Figura 1.6. Esquema de diferenciación celular basado en el paisaje de Waddington	24
Figura 1.7. Esquema resumido de la capacidad multipotente de las células MSC	27
Figura 1.8. Sistema well of the well, para el cultivo de embriones libres de ZP	29
Figura 1.9. Esquema del sistema CRISPR/Cas9	32
Figura 1.10. Esquema de sistemas activadores de la transcripción basados en CRISPR	34
<b>Figura 2.1.</b> Esquema de evaluación de la capacidad de ASC y FFB para formar parte de un embrión en desarrollo	43
Figura 2.2. Maduración <i>in vitro</i> de oocitos bovinos	45
Figura 2.3 Inmunotipificación de células derivadas de tejido adiposo de res	52
Figura 2.4. Morfología del cultivo primario de ASC (A) y FAB (B)	54
<b>Figura 2.5.</b> Inmunotipificación de células derivadas de tejido adiposo <i>in vivo</i> por citometría de flujo.	54
Figura 2.6. Evaluación de la multipotencialidad de las células derivadas de tejido adiposo	55
Figura 2.7. Cultivo y tinción de células ASC.	56
Figura 2.8. Embriones partenogenéticos de día 7 p.a	58
Figura 2.9. Agregados de FFB luego del cultivo <i>in vitro</i> con embriones partenogenéticos	58
Figura 3.1. Esquema resumido de SCNT y agregación embrionaria	70

Figura 3.2. Enucleación de oocito bovino libre de ZP	72
Figura 3.3. Evaluación de la estrategia de agregación embrionaria en clones bovinos ASC	78
<b>Figura 3.4.</b> Abundancia relativa de transcriptos de <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> y <i>KRT18</i> en blastocistos bovinos de SCNT	83
<b>Figura 4.1</b> . Esquema experimental general de microinyección de cigotos con el sistema CRISPR, cultivo y análisis embrionario	97
Figura 4.2. Esquema para el diseño y clonado de los oligonucleótidos en el vector de expresión	98
Figura 4.3. Esquema de síntesis de ARNm codificante para dCas9-VP160	102
Figura 4.4: Evaluación del tamaño del ARNm por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante	108
Figura 4.5. Inmunodetección de la proteína dCas9-VP160 en embriones murinos microinyectados.	108
Figura 4.6. Inmunodetección de la proteína dCas9-VP160 en embriones bovinos microinyectados	109
<b>Figura 4.7.</b> Abundancia relativa de transcriptos de <i>CDX2</i> en blastocistos bovinos control o microinyectados: dCas9_Cdx2A, dCas9_Cdx2B y dCas9_Cdx2Tot	111
<b>Figura 4.8</b> Abundancia relativa de transcriptos en embriones control (línea punteada) o microinyectados con CRISPR-on	113
<b>Figura 4.9</b> . Abundancia relativa de transcriptos en embriones murinos 4 días post microinyección, respecto de embriones control sin inyectar	115

## Abreviaturas

%: Porcentaje °C: Grados Celcius µg: Microgramo µl: Microlitro µM: Micromolar µpozos: Micropozos 6-DMAP: 6-Dimetilaminopurina ADN: Ácido desoxirribonucléico ADNc: ADN complementario AGE: Activación del genoma embrionario ARN: Ácido ribonucleico ARNi: ARN de interferencia ARNm: Ácido ribonucleico mensajero ART: Técnicas de reproducción asistida ASC: Célula mesenquimal de tejido adiposo ATB/ATM: Atibiótico-Antimicótico BO: Brackett y Oliphant BSA: Albúmina sérica bovina Ca+2: Ión Calcio CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de Calcio Cas9: Nucleasa9 asociada a CRISPR CB: Citocalasina B cc: Centímetros cúbicos CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono COC: Complejos oocito-células del cúmulus Col: Colaboradores CP: Corpúsculo polar CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas CRISPR-on: Sistema CRISPR inductor de la expresión génica DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole dCas9: Cas9 deficiente de actividad dCas9\_SM: Embriones microinyectados con dCas9-VP160 y 4 guías específicos para SMARCA4 dCas9\_TF: Embriones microinyectados con dCas9-VP160 y 4 guías específicos para TFAP2C DMSO: Dimetilsulfóxido **DNMT**: Dimetil transferasa DPBS: Solución tampón fosfato Dublecco Dr.: Doctor eCG: Gonadotrofina coriónica equina EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético ER: Embrión reconstruido ESC: Célula madre embrionaria FAB: Fibroblastos adultos bovinos

FAUBA: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. FFB: Fibroblastos fetales bovinos FITC: Isotiocianato de fluoresceína FIV: Fecundación in vitro FSH: Hormona folículo estimulante g: Fuerza centrífuga GFP: Proteína verde fluorescente GV: Vesícula germinal hCG: Gonadotrofina coriónica humana Hs: Horas IA: Inseminación artificial IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide IETS: Sociedad Internacional de Tecnologías Embrionarias IFSSA: Industrias Frigoríficas Sur S.A. IgG: Inmunoglobulina G INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Io: Ionomicina **IP:** Intraperitoneal ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular KO: Knock Out LH: Hormona luteinizante LOS: Síndrome de la cría grande MA: Masachusets MCI: Macizo celular interno mg: Miligramo MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnesio MI: Metafase I MII: Metafase II min: Minutos MIV: Maduración in vitro ml: Mililitro mM: Milimolar MOET: Multi ovulación y transferencia de embriones MOPS: Ácido 3-morfolino propanosulfónico MSC: Célula madre mesenquimal MSU: Universidad Estatal de Michigan n: Número N<sub>2</sub>: Nitrógeno nm: Nanómetros NT: Transferencia nuclear NY: Nueva York O<sub>2</sub>: Oxígeno OPU: Aspiración folicular de vacas en pie p.a.: Post activación

p/v: Peso en volumen PA: Activación partenogenética Pág: Página PAM: Motivo adyacente al protoespaciador pb: Pares de bases PCR: Reacción en cadena de la polimerasa PIV: Producción de embriones in vitro pL: Picolitros PN: Pronúcleo PVA: Polivinil Alcohol PVA: Polyvinilalcohol PVP: Polivinilpirrolidona qPCR: PCR cuantitativa **RPM:** Revoluciones por minuto RTqPCR: PCR cuantitativa con transcripción reversa SCNT: Transferencia nuclear de células somáticas SDS: Solución de dilución de semen Seg: Segundos SFB: Suero fetal bovino sgRNA: ARN guía simple cadena SHAM: Control de microinyección SOV: Superovulación SWS: Solución de lavado de semen TALEN: Nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción TALP-H: Medio tirode albúmina lactato piruvato con hepes TCM 199: Medio de cultivo de tejidos 199 TE: Trofoectodermo TIV: Transcripción in vitro UI: Unidades internacionales USA: Estados Unidos de América UV: Luz ultravioleta v/v: Volumen en volumen WOW: Sistema de cultivo en micropozos Wt: Nativo ZFN: Nucleasas con dedos de Cinc ZP: Zona pelúcida

#### Resumen

<u>Título de la Tesis</u>: "Células donantes mesenquimales, agregación embrionaria y modulación de la expresión génica mediada por CRISPR/dCas9 para clonación bovina" <u>Autor</u>: Lic. Virginia Savy

<u>Comité consejero</u>: Dr. Daniel F. Salamone, Dra. Romina Jimena Bevacqua. <u>Palabras clave</u>: SCNT, embrión, células madre de tejido adiposo, ASC, CRISPR-on, dCas9-VP160

La transferencia nuclear de célula somática (SCNT) es una técnica de reproducción asistida con gran potencial, tanto a fines de investigación básica como aplicada. Sin embargo, a la fecha, su eficiencia continúa siendo muy baja. En bovinos, los embriones producidos mediante SCNT muestran una competencia deficiente para su desarrollo *in vitro* e *in vivo* y cerca del 70% falla en el proceso de implantación al ser transferidos a hembras receptoras sincronizadas.

El trabajo realizado en esta Tesis involucró el uso de estrategias alternativas con el fin de corregir estas deficiencias e incrementar tanto la producción como la calidad de los embriones clonados. Inicialmente, se evaluó la factibilidad de mejorar la producción in vitro de blastocistos mediante el uso de células mesenquimales de tejido adiposo (ASC), en combinación con la estrategia de agregación embrionaria. Para esto, se estableció un protocolo sencillo para el aislamiento de ASC bovinas y se confirmó el carácter mesenquimal en el 80% de las células en cultivo, mediante inmunotipificación e inducción de la diferenciación hacia otros linajes mesodérmicos. Posteriormente, estas células se emplearon para reconstruir embriones bovinos libres de zona pelúcida por SCNT, empleando fibroblastos adultos bovinos (FAB) como control. Además, los embriones reconstruidos se cultivaron de forma individual o de a pares, para estudiar el efecto de la agregación embrionaria. Nuestros resultados permiten confirmar que el uso de ASC como donantes de núcleo o la agregación embrionaria no son suficientes para mejorar la eficiencia en la producción de blastocistos. Además, no se observó un efecto sinérgico del uso simultáneo de ambas estrategias, aunque, sobre la base de trabajos previos, no se descarta una mejora en la tasa de nacidos vivos.

A continuación, se diseñó y evaluó una estrategia sumamente novedosa para mitigar las fallas asociadas a la expresión génica aberrante del trofoblasto, como son la implantación y

placentación deficiente de los clones. En este sentido, empleamos el sistema CRISPR/dCas9-VP160 (CRISPR-on) para inducir la expresión endógena de los genes CDX2, SMARCA4 y TFAP2C, de modo de dirigir la diferenciación a trofoectodermo (TE). Dado que a la fecha, y bajo nuestro conocimiento, no existen reportes sobre el uso de este sistema para la modulación de la expresión de genes endógenos en embriones, inicialmente estudiamos esta técnica en embriones producidos por fecundación in vitro (FIV), con el fin de trasladarla luego a embriones clonados. Mediante análisis por inmunofluorescencia se comprobó la correcta síntesis y traducción del ARNm codificante para dCas9-VP160, en embriones murinos y bovinos. Además, por ensayos de RTqPCR se comprobó que el sistema es eficiente para la inducción de la expresión de SMARCA4 dos días luego de la microinyección; aunque el efecto dejó de ser detectable a nivel de ARNm a día 4 y 7. No sólo se evidenció la modulación de la expresión en el gen diana, sino también en la de efectores que operan río abajo de éste, como es CDX2. Estos resultados alientan la aplicación de este sistema a embriones de PIV y principalmente producidos por SCNT, con el fin de corregir la expresión génica aberrante de los mismos. Considerando que una mejora en el desarrollo y calidad del TE podría mejorar el reconocimiento materno-fetal, se estima que la aplicación de esta estrategia en clones, así como en embriones producidos por otras técnicas de producción in vitro, tendría un impacto positivo sobre la placentación y, posiblemente, sobre las tasas de producción de crías vivas saludables. Se requieren análisis adicionales para confirmar esta hipótesis.

#### Abstract

<u>*Title:*</u> Mesenchymal donor cells, embryo aggregation and gene expression modulation mediated by CRISPR / dCas9 for bovine cloning

Keywords: SCNT, embryo, adipose tissue stem cells ASC, CRISPR-on, dCas9-VP160.

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is an extremely valuable assisted reproductive technique with potential both for basic and applied research. However, up to date, the efficiency of the technique remains very low. In cattle, SCNT embryos show low developmental competence *in vitro* and *in vivo* and approximately 70% fail in the implantation process when transferred to the uterus of synchronized recipient females.

This Thesis evaluated alternative strategies aiming at correcting these deficiencies and increasing SCNT embryo production and quality. Initially, the feasibility of improving the *in vitro* production of blastocysts was evaluated through the use of less differentiated donor cells, such as adipose tissue derived mesenchymal cells (ASC, from adult stem cells), in combination with embryo aggregation strategy. To this aim, a simple protocol for the isolation of adult bovine ASC was established and the mesenchymal character was confirmed in 80% of the cells in culture, by means of immunotyping and induction of the differentiation towards other mesodermal lineages. Subsequently, these cells were used as donors for SCNT zona-free embryo production, using adult bovine fibroblasts (FAB) as control. In addition, the reconstructed embryos were cultured individually or in pairs, to evaluate the effect of embryo aggregation strategy. Our results confirmed that neither the use of ASC as nuclear donors nor the embryo aggregation strategy are sufficient to improve the efficiency of blastocyst production. Moreover, we did not find a synergistic effect of the simultaneous use of both strategies, although, based on previous reports, it is possible to envision an improvement in the rate of live births.

Then, an innovative strategy was designed and evaluated to improve the implantation and placentation processes of *in vitro* derived embryos. This entailed the use of the CRISPR/dCas9-VP160 system (CRISPR-on) to induce the endogenous expression of relevant trophectoderm (TE) genes such as *CDX2*, *SMARCA4* and *TFAP2C*. To the best of

our knowledge, there are no reports to date regarding the use of this system for the modulation of endogenous gene expression in mammal embryos, and for this reason we initially evaluated this technique in embryos produced by *in vitro* fertilization (FIV), for subsequent adaptation for bovine SCNT embryo production. By means of immunofluorescence analysis, correct synthesis and translation of the coding mRNA for dCas9-VP160 were confirmed both in murine and bovine embryos. Then, by RTqPCR assays, it was shown that the system is efficient for the induction of SMARCA4 expression two days after the microinjection; although the induction could no longer be detected by day 4 and 7, at the mRNA level. CRISPR-on resulted not only in modulation of the target gene expression, but also of downstream effectors, such as CDX2. These results encourage the use of this system for SCNT embryo production, in order to improve their aberrant gene expression. Considering that an improvement in the TE development and quality could lead to an improved maternalfetal recognition, the application of this system could result in improved placentation and, possibly, higher production rates of healthy live offspring not only for the improvement of SCNT but also for other inefficient reproductive processes and techniques. Further analysis are required to confirm this hypothesis.

xxi

Capítulo 1: Introducción general

# 1.1. Fisiología de la reproducción bovina y desarrollo embrionario preimplantatorio

Por su interés productivo, el bovino constituye una de las especies domésticas más importantes a nivel mundial y, en este sentido, se han realizado grandes esfuerzos tanto por aumentar la eficiencia reproductiva de esta especie como por mejorar la calidad de los productos derivados. Las técnicas de biotecnología reproductiva y protocolos de producción *in vitro* de embriones han sido ampliamente desarrollados en esta especie, permitiendo la obtención de animales de elite y reduciendo el tiempo generacional para el progreso genético.

Para poder optimizar las estrategias de reproducción asistida y/o diseñar otras tecnologías modernas resulta fundamental conocer los mecanismos básicos de la fisiología reproductiva y del desarrollo embrionario, los cuales se describirán a continuación.

# 1.1.1 Fisiología reproductiva de la hembra bovina

#### 1.1.1.1 Oogénesis y desarrollo folicular

Las hembras bovinas son poliéstricas continuas, es decir, su ciclo reproductivo o ciclo estral se reitera durante toda la vida reproductiva del animal, excepto durante los períodos de gestación o puerperio. El ciclo estral se define como el período comprendido entre dos fases de receptividad al macho y en éste las vacas sufren cambios hormonales importantes que impulsarán la ovulación de un único oocito maduro y competente. De existir fecundación se dará lugar a la formación del embrión que será gestado por, en promedio, 283 días. De no haber fecundación, el ciclo volverá a iniciarse para generar un nuevo oocito competente.

Las gametas femeninas u oocitos son células haploides que se forman durante el desarrollo fetal de la hembra, en un proceso conocido como oogénesis. Inicialmente, las células germinales diploides ubicadas en el ovario en desarrollo, se dividen por mitosis hasta alcanzar un número finito de células primordiales u oogonias. Estas células inician la meiosis, durante la cual los cromosomas homólogos se aparean y ocurre el intercambio de ADN entre regiones similares de éstos, en un proceso conocido como "*crossing over*".

Si bien iniciada, la meiosis es arrestada en el estadio de profase de la primera división meiótica (Profase I), dando lugar a los oocitos primarios. Este arresto será mantenido hasta la pubertad por la presencia de hormonas inhibitorias como el estradiol y la hormona antimulleriana (Yang y Fortune, 2008). Hacia los 90 días de la gestación, los oocitos primarios se rodean de una capa de células somáticas epiteliales formando, en conjunto, los folículos primordiales (Sawyer y col., 2002). El desarrollo de estos folículos, que ocurre en coordinación con la oogenesis, se denomina foliculogénesis (Figura 1.1). Hacia los 120 días de gestación y por razones que aún se desconcen, algunos de los folículos entran en fase de activación en la que las células somáticas que forman los folículos primordiasles adquieren una forma cúbica, dando lugar a los folículos primarios (Yang y Fortune, 2008; Araújo y col., 2014). Luego, en respuesta a la presencia de factores externos, los folículos crecen en tamaño y se rodean de sucesivas capas de células somáticas (llamadas ahora células de la granulosa) dando lugar a los folículos secundarios. Durante la transición de folículo primario a secundario ocurren el crecimiento y reorganización de la ultraestructura del oocito y, además, las células de la granulosa secretan proteínas y polisacáridos para formar una cubierta glicoproteica que rodea al oocito, llamada Zona Pelúcida (ZP) (Hyttel y col., 1997). Esta capa interviene más adelante, en el proceso de fecundación, interactuando con el espermatozoide e impidiendo la polispermia y protege posteriormente al embrión durante el desarrollo preimplantatorio (Hoodbhoy y Dean, 2004; Papi y col., 2012). Hacia el final del desarrollo del folículo secundario, las células de la granulosa se rodean por una capa de células llamadas células de la teca. Las células de la teca y de la granulosa proliferan y producen hormonas y otras secreciones que se acumulan entre las propias células dando lugar a un antro folicular, por lo que el folículo se reconoce como folículo antral. Al momento del nacimiento de una hembra bovina, sus ovarios contendrán miles de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales tempranos, que representan la máxima reserva ovárica de esa hembra.



Figura 1.1. Esquema de la foliculogénesis. Imagen adaptada (Hall y col., 2016).

La siguiente etapa de la foliculogénesis es dependiente de hormonas y ocurre una vez alcanzada la pubertad. Las células de la granulosa junto con las células de la teca, desarrollan receptores para las hormonas gonadotrópicas luteinizante (LH) y folículoestimulante (FSH), secretadas en respuesta a la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH) en la pubertad. Bajo la influencia de estas hormonas, las células de la teca y de la granulosa proliferan y estimulan las secreciones foliculares. Por su parte, el oocito o vesícula germinal (VG) arrestado en Profase I reinicia la meiosis justo antes de la ovulación, en respuesta a un pico de LH preovulatorio y avanza hasta la metafase I, donde los cromosomas homólogos se aparean formando la placa metafásica. Al finalizar la meiosis I, los cromosomas homólogos se separan aleatoriamente hacia direcciones opuestas del oocito y ocurre la citocinesis. Dado que la placa metafásica no se forma en el centro del oocito sino en la periferia del mismo, la citocinesis ocurre de forma asimétrica dando origen a una célula pequeña con poco citoplasma, el 1er corpúsculo polar (CP), y a una célula grande y haploide que será el oocito secundario. Tanto el "crossing over" como la segregación aleatoria de cromosomas homólogos son las principales fuentes de variabilidad genética asociadas a la reproducción sexual. Este oocito secundario, ubicado dentro del folículo de De Graff, continúa la meiosis hasta el estadio de metafase II (MII), donde las cromátidas hermanas se ubican en el ecuador de la nueva placa metafásica. En este estadio ocurre un nuevo arresto de la meiosis, que solo se reiniciará si ocurre la fecundación, o por activación partenogenética, como se discutirá más adelante. El oocito en MII se dice que es maduro y competente para la fecundación y está listo para ser ovulado (Albarracín y col., 2005).

## 1.1.1.2 Maduración oocitaria, ondas foliculares y ovulación.

Desde el reinicio de la meiosis hasta su arresto en MII, el oocito adquiere la competencia y la capacidad para dar soporte al desarrollo embrionario, en un proceso que se conoce como maduración oocitaria. Este proceso puede separarse espacialmente en maduración nuclear y maduración citoplasmática, aunque las 2 ocurren en simultáneo y de manera coordinada. La maduración nuclear consiste en la culminación de la meiosis I con la formación del 1er CP y el oocito secundario y el posterior arresto de esta célula haploide en MII, como se describió anteriormente. Por su parte, la maduración citoplasmática implica, principalmente, la redistribución de las organelas y la acumulación de ARN mensajeros, proteínas, y factores de transcripción que serán necesarios para superar las primeras etapas del desarrollo embrionario preimplantatorio (Hyttel y col., 1997). En este proceso, las mitocondrias aumentan en número y se distribuyen uniformemente por el citoplasma, para proveer la energía necesaria para la maduración. Hay un aumento importante en el número de ribosomas, para satisfacer la síntesis y acumulación de proteínas y factores de transcripción. Además, el aparato de Golgi se fragmenta y dispersa en el citoplasma y se observa la acumulación de iones y lípidos, que serán fuente de energía en los primeros estadios embrionarios. Los gránulos corticales, vesículas derivadas del aparato de Golgi que contienen enzimas hidrolíticas, migran hacia la periferia y se ubican inmediatamente por debajo de la membrana plasmática. De esta forma, a través de la maduración nuclear y citoplasmática, el oocito adquiere la maquinaria biológica necesaria para permitir la fecundación y asegurar un adecuado desarrollo embrionario inicial.

La maduración oocitaria es facilitada por la comunicación del oocito con las células de la granulosa. Al formarse los folículos terciarios o antrales, pueden distinguirse 2 subpoblaciones derivadas de las células de la granulosa que se diferencian tanto morfológica como funcionalmente: las células del cúmulus, aquellas que rodean inmediatamente al oocito y se mantienen en íntimo contacto a través de proyecciones que atraviesan la ZP y se unen al oolema (membrana del oocito); y las células de la granulosa

mural, aquellas que recubren las paredes del folículo, por debajo de las células de la teca. Las células del cúmulus nutren al oocito durante la etapa final del desarrollo formando un complejo compacto llamado Complejo oocito-cúmulus (COC). La comunicación entre estas células es crucial tanto para promover la maduración oocitaria como para regular la diferenciación de las células del cúmulus y ocurre por dos vías complementarias: por un lado, a través del intercambio de moléculas de pequeño tamaño por uniones de hendidura, también llamadas "gap" y, por otro lado, a través de una vía de señalización parácrina (Gilchrist y col., 2004). En simultáneo a la maduración del oocito y en respuesta a la presencia de gonadotrofinas, las células del cúmulus secretan ácido hialurónico formando una matriz extracelular densa, que lleva al distanciamiento de las células entre sí y con el oocito y a la pérdida de las uniones tipo gap. Esto se observa claramente como una expansión y mucificación del cúmulus y se reconoce como maduración del cúmulus. Es el COC maduro y expandido (y no simplemente el oocito en MII) el que será liberado del folículo en la ovulación.

En animales monotocos, si bien un único COC alcanza la competencia y es ovulado en cada ciclo reproductivo, son muchos los folículos que responden a la presencia de LH y FSH y transitan por los estadios de folículo secundario y terciario. El desarrollo folicular en bovinos ocurre en forma de ondas foliculares, en las que un grupo de folículos es reclutado para iniciar su desarrollo estableciéndose una competencia de crecimiento entre ellos. Sólo un folículo será dominante en cuanto a velocidad de crecimiento y tamaño y éste, a través de la secreción de hormonas inhibitorias, impedirá el ulterior desarrollo de los folículos remanentes, que entran en regresión y finalmente involucionan entrando en atresia (Salamone y col., 1999). Particularmente, el desarrollo folicular bovino comprende 2 a 3 ondas foliculares por ciclo estral y el folículo dominante preovulatorio, también llamado folículo de De Graaf, se origina en la última onda (Eppig, 2001). En respuesta a un pico de LH se desencadena la liberación del COC maduro y expandido hacia el oviducto, proceso conocido como ovulación (Figura 1.1). Luego de la ovulación, las células de la granulosa que formaban las paredes del folículo sufren una transformación, llamada luteinización, y forman el cuerpo lúteo, glándula endócrina que secretará las hormonas necesarias para preparar el útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación, en caso de fecundación (Hernández Cerón y Zarco, 1998).

## 1.1.2 Fecundación y desarrollo embrionario preimplantatorio.

El encuentro de las gametas femeninas y masculinas ocurre, in vivo, en el oviducto materno. Durante el desplazamiento de los espermatozoides por el tracto femenino, éstos sufren modificaciones y adquieren la competencia para fecundar al oocito maduro, proceso llamado capacitación espermática (Knobil y Nelly 1994). Los espermatozoides capacitados atraviesan el cúmulus expandido y la ZP para finalmente fusionar su membrana con la del oocito. La fusión del oocito con un espermatozoide induce una serie de oscilaciones de calcio ( $Ca^{+2}$ ) intracelular (Fissore y col., 1992), que desencadenarán múltiples procesos tan importantes como son la extrusión de los gránulos corticales y la activación del oocito (Alberio y col., 2001; Williams y col., 2002). La liberación de las enzimas contenidas en los gránulos corticales modifica las proteínas de la ZP, impidiendo la entrada de otros espermatozoides y, consecuentemente, la polispermia. Con la activación, inducida por las oscilaciones de Ca<sup>+2</sup>, el oocito saldrá del arresto en MII y finalizará la meiosis, dando lugar nuevamente a una célula pequeña prácticamente sin citoplasma, el segundo CP, y al óvulo, conteniendo los pronúcleos femenino y masculino. La fusión de los pronúcleos, proceso llamado singamia, dará lugar a la formación de la primera célula diploide con la carga cromosómica completa.



**Figura 1.2. Esquema del desarrollo preimplantatorio.** El oocito 2rio maduro es fecundado por el espermatozoide (Sp) para formar el cigoto, que iniciará el desarrollo preimplantatorio en el oviducto. En el estadio de blastocisto, donde se diferencia el macizo celular interno (MCI) y el trofoectodermo (TE), el embrión alcanza el útero materno. PN, pronúcleos. Imagen modificada de Zhou y Dean (2015).

El inicio del desarrollo preimplantatorio embrionario ocurre en el oviducto y depende de las proteínas y ARNs almacenados durante la maduración oocitaria. El cigoto unicelular se divide por mitosis sin previo aumento de tamaño, dando lugar a 2 células hijas llamadas blastómeras (Figura 1.2). Este ciclo de división consiste en una fase de replicación de ADN seguida casi inmediatamente por mitosis, en ausencia de fases de crecimiento (Fases Gap 1 y Gap 2) y se repite de forma sucesiva dando lugar a un embrión de 4, 8 y 16 células (Revisado por Barnes y Eyestone, 1990). El embrión bovino de 8 a 16 células sufre una remodelación global de la estructura de la cromatina, volviéndose transcripcionalmente activo (Augustin y col. 2001) y en paralelo ocurre la degradación de los ARNs y proteínas de origen materno, por lo que la regulación de las siguientes etapas del desarrollo es dirigida por el propio embrión y su relación con el entorno (Revisado por Graf y col., 2014). Hacia el día 5 del desarrollo embrionario ya no es posible diferenciar blastómeras individuales y el embrión se conoce como mórula. Es en el estadio de mórula cuando se establecen uniones estrechas entre las blastómeras, las células se polarizan y se inicia la primera diferenciación celular. Las células localizadas en la periferia del embrión producen secreciones formando una cavidad llamada blastocele, dando lugar a la formación del blastocisto. En este estadio embrionario conviven 2 subpoblaciones celulares diferentes morfológica y transcripcionalmente: el macizo celular interno (MCI), que dará lugar principalmente a la formación del feto, y el trofoectodermo (TE) del que derivarán las estructuras extraembrionarias (Degrelle y col., 2005; Ozawa y col., 2012). Es durante el estadio de mórula o blastocisto temprano que el embrión bovino terminará su tránsito por el oviducto, para llegar finalmente al útero materno, entre los días 4 y 6 del desarrollo.

Una vez alcanzado el útero, el embrión se libera de la zona pelúcida (eclosiona) y crece tomando una forma inicialmente ovoide, tubular y finalmente filamentosa, debida a la elongación del TE (Degrelle y col., 2005). En este período el TE cumple un rol fundamental: por un lado, a través de la secreción de Interferón tau (Bazer y col., 2008) induce el reconocimiento de la preñez por parte de la madre; por otro lado, hacia el día 21 del desarrollo embrionario, interviene activamente en la adhesión e implantación del embrión al endometrio materno y forma la porción fetal de la placenta. La placenta es un órgano transitorio que media la interacción entre el feto y la madre, permitiendo el flujo de nutrientes, deshechos y hormonas. Además, tiene una función endócrina *per se*, que es crucial para el mantenimiento de la gestación (Chavatte-Palmer y col., 2012).

El desarrollo normal del embrión y, luego, del feto y tejido extraembrionario depende de cambios sucesivos que deben ocurrir de forma coordinada. Entre ellos, se destacan cambios en la arquitectura de la cromatina, relacionados principalmente al estado de metilación del ADN o acetilación de histonas, que ocurren muy temprano en el desarrollo. Estas marcas presentes en el genoma y la cromatina se denominan marcas epigenéticas (del griego *epi*, sobre) y regulan en gran medida la expresión génica, dirigiendo la diferenciación y especificación celular. En el cigoto bovino, el genoma paterno y materno sufren una desmetilación general del genoma, y luego, en el estadio de 8 células, una remetilación *de novo* (Revisado por Reik y col., 2001). Esta reprogramación de las marcas epigenéticas está muy conservada entre las especies de mamíferos y se ha demostrado que es crítica tanto para lograr una adecuada diferenciación celular como para alcanzar, finalmente, la complejidad biológica de un organismo multicelular.

1.1.3 Diferenciación celular durante el desarrollo embrionario preimplantatorio, expresión diferencial de genes.

En embriones de mamíferos, la primer clara diferenciación celular se manifiesta en la transición de mórula a blastocito, cuando se forma el macizo celular interno (MCI) y trofoectodermo (TE), que originarán al feto y a tejidos extraembrionarios, respectivamente. Los mecanismos que gobiernan la diferenciación embrionaria han sido ampliamente estudiados en el ratón, debido principalmente a la disponibilidad de modelos de disrupción de genes (*KO, del inglés "Knock Out"*) que facilitaran desentrañar la función biológica de los principales actores. Hoy, a través del uso de nuevas herramientas de biología molecular, se han realizado importantes aportes en cuanto a las diferencias moleculares de las vías de diferenciación celular entre el ratón y otras especies, como el bovino.

Como se describió, durante la oogénesis y la maduración del oocito ocurre la acumulación de proteínas y transcriptos maternos que, luego de la fecundación, permitirán el desarrollo del embrión hasta que éste se vuelva "transcripcionalmente independiente", luego de la activación del genoma embrionario (AGE). La AGE es el resultado de una remodelación global de la cromatina en la que el embrión pasa de un estado quiescente (en referencia a la expresión génica) a un estado de síntesis activa de ARNs (Revisado por Barnes y Eyestone, 1990). Este proceso tiene lugar en estadio de 2 células en ratón y ocurre más tardíamente en bovinos, durante la transición de 8 a 16 células (Augustin y col., 2001). Luego de la AGE serán sintetizados todos aquellos factores de transcripción que orquestarán el posterior desarrollo y diferenciación del embrión.

La correcta diferenciación a los linajes de MCI y TE involucra una dinámica regulación de la expresión génica, tanto a nivel temporal como espacial. En embriones

murinos, la primera diferenciación celular es dirigida por una expresión antagonista de OCT4 y CDX2. Si bien inicialmente ambos se expresan de forma ubicua, el mecanismo de regulación implica la represión de la expresión de OCT4 por parte de CDX2 en el TE e inversamente, de CDX2 en el MCI, lo que da lugar en el estadio de blastocisto tardío a la localización exclusiva de OCT4 en el MCI y de CDX2 en el TE (Revisado por Rossant, 2004). En bovinos, CDX2 se expresa a partir de las 8 células y también se localiza exclusivamente en el TE del blastocisto, aunque se demostró que no es esencial para el establecimiento del TE sino para su mantenimiento (Berg y col., 2011). En esta especie (igual que en humanos y cerdos) el mecanismo de diferenciación no requiere la restricción de OCT4 al MCI del blastocisto, detectándose altos niveles de OCT4-ARNm en el TE de embriones bovinos in vitro de día 11, aun en presencia de transcriptos de CDX2 (Berg y col., 2011). Algunos autores sugieren que la alta expresión de OCT4 en el TE de blastocistos bovinos tardíos se correlaciona con un retraso en la diferenciación a TE y al mantenimiento de una población de células pluripotentes en este tejido, que podría ser consecuencia del desfasaje temporal que se observa entre el arribo del blastocisto al útero materno y su implantación (Degrelle y col., 2005). Así, la presencia de OCT4 no sería necesaria en el TE de ratón ya que la implantación ocurre inmediatamente luego de la formación del blastocisto. La proteína OCT4 parece estar específicamente localizada en el epiblasto de embriones bovinos en estadios más avanzados, como embriones elongados (Degrelle y col., 2005; Vejlsted y col., 2005).



**Figura 1.3. Modelo resumido de regulación de la diferenciación mediada por HIPPO.** En el embrión de 16 células, la vía de regulación HIPPO censa la interacción célula-célula y de esta forma induce directamente la expresión localizada de *CDX2* en las células externas, al tiempo que media la expresión de *SOX2* en las células internas, dando lugar al establecimiento del TE y MCI, respectivamente. Figura adaptada de Wicklow y col, 2014.

Para promover una correcta diferenciación celular resulta necesario una precisa regulación en la expresión génica y, también, la apropiada disposición espacial de las blastómeras. En cuanto a disposición, todas las blastómeras de embriones de mamíferos de 8 células son equivalentes, mientras que en embriones de 16 células pueden distinguirse blastómeras "internas" y "externas", con diferente contacto célula-célula, lo que establece una cara apical en las células externas marcando su polarización. La vía de regulación HIPPO es una red muy amplia de factores de transcripción que regulan la proliferación celular y diferenciación en respuesta a la interacción y comunicación entre blastómeras (Wicklow y col., 2014). Esta vía participa en la especificación de los linajes celulares a través del silenciamiento de *SOX2* y la inducción de *CDX2* en células de la capa externa y del proceso inverso en células internas (Figura 1.3). Además, la vía HIPPO, en conjunto con la polarización de las blastómeras, permite sostener la expresión de factores de pluripotencia exclusivamente en las células del MCI hasta la implantación.

En ratón, las células del MCI mantienen el estado de pluripotencia mediante la expresión y formación de un complejo entre OCT4, SOX2 y NANOG (Avilion y col.,

2003; Masui y col., 2007). En bovinos, *OCT4* y *SOX2* están presentes como transcriptos maternos y además se expresan en el embrión a partir de la AGE. Al igual que en ratón, la co-expresión de éstos y *NANOG* es detectada en el MCI de blastocitos bovinos (Degrelle y col., 2005, Ozawa y col., 2012), confirmando su importante rol en el mantenimiento de la pluripotencia de éstas células (Avilion y col., 2003). De modo similar, células madre embrionarias en cultivo muestran una expresión relativamente alta de estos 3 factores de trascripción (Revisado por Young, 2011). La expresión de *NANOG* no se detecta hasta el estadio de 8-16 células en embriones bovinos y su localización se vuelve exclusiva para células del MCI en estadio de blastocisto (Kuijk y col., 2008). Mediante el uso de técnicas de ARN de interferencia (ARNi) y de líneas de células madre inducibles a TE, se ha logrado dilucidar el rol de factores de transcripción tales como SMARCA4 y TFAP2C, los cuales están presentes muy temprano en el desarrollo embrionario y regulan la expresión de *NANOG* y *CDX2*, respectivamente, proponiendo nuevos mecanismos implicados en la regulación de la diferenciación a TE de embriones murinos (Carey y col., 2015; Cao y col., 2015).

TFAP2C es un factor de trascripción presente en una gran variedad de especies con un alto grado de conservación de secuencia. TFAP2C participa del establecimiento de la polaridad de las células, la formación del blastocele y la diferenciación celular (Lee y col., 2015). En embriones murinos, este factor de transcripción promueve la diferenciación hacia el trofoectodermo por 2 mecanismos principales: (1) inducción de la expresión de CDX2 en estadios de 2-4 células y (2) inhibición de la expresión de la vía de señalización HIPPO en las células externas, tras favorecer su polarización (establecimiento de una cara apical) (Figura 1.4, Cao y col., 2015). Inclusive, la sobreexpresión de TFAP2C en cultivos de células embrionarias es suficiente para inducir su diferenciación a TE (Kuckenberg y col., 2010). La vía de regulación de CDX2 mediada por HIPPO parece estar conservada en bovinos (Berg y col., 2011; Kusama y col., 2016). En ratón, se determinó que el ARNm de TFAP2C está presente tanto en oocitos MII (ARNm materno) como en embriones preimplantatorios (ARNm embrionario), alcanzando su máximo de abundancia relativa en el estadio de mórula (Choi y col., 2012; Cao y col., 2015). En estadios de blastocisto, TFAP2C se localiza exclusivamente en el TE y reprime de forma directa la expresión de OCT4, por unión a la región regulatoria de OCT4 (Kuckenberg y col., 2012). En el bovino, en cambio, no se detecta ARNm de TFAP2C en oocitos ni en embriones bovinos de FIV previo al estadio de mórula. El pico de expresión también se alcanza en estadio de mórula y luego se observa una caída en la expresión en el estadio de blastocisto (Aston y col., 2009). En bovinos, se confirmó la expresión de *TFAP2C* en células del TE, en presencia de ARNm de *OCT4*, por lo que este factor de transcripción tampoco estaría implicado en la represión de su expresión (Berg y col., 2011).



**Figura 1.4. Modelo de regulación de la diferenciación mediada por TFAP2c.** *TFAP2C* promueve la diferenciación hacia el trofoectodermo al funcionar como un regulador clave de la transcripción de *CDX2* en estadios temprano y regular más tarde la polaridad celular y la represión de la señalización HIPPO dependiente de la posición. Figura adaptada de Cao y col., 2015.

Por otro lado, SMARCA4 (también llamado BRG1) es una proteína remodeladora de la cromatina que se acumula durante la oogenesis y participa tanto de la AGE como de la regulación de la diferenciación celular, al inducir o reprimir la expresión génica (Bultman y col., 2006; Graf y col., 2014; Carey y col., 2015). Esta proteína (como parte de un complejo proteico) es reclutada por diferentes factores de trascripción a sitios específicos del genoma y, de forma ATP-dependiente, altera tanto la conformación como la posición de nucleosomas, modulando así la accesibilidad del ADN para la transcripción. Si bien múltiples genes son blancos de regulación de SMARCA4, se ha demostrado que en estadios muy tempranos del desarrollo de embriones murinos, SMARCA4 regula negativamente la expresión de *NANOG* al formar un complejo con la histona-deacetilasa 1 (HDAC1) y promover la remoción de las acetilaciones de histonas (marcas epigenéticas

asociadas a un estado transcripcional activo) en la región promotora de *NANOG*, facilitando así la diferenciación de éstas al linaje TE (Carey y col., 2015). Más tarde en el desarrollo, SMARCA4 induce un cambio en la arquitectura de la cromatina en la región regulatoria de *NANOG* y de esta forma silencia completamente su expresión en el TE (Figura 1.5).



**Figura 1.5. Modelo de regulación del silenciamiento de** *NANOG* **mediado por SMARCA4.** SMARCA4 interactúa con HDAC1, removiendo las acetilaciones de histonas de la región regulatoria de *NANOG*. Además, en la diferenciación a TE, SMARCA4 induce la remodelación de la cromatina, silenciando la expresión de *NANOG*. Los círculos grises indican presencia de nucleosomas mientras que el círculo punteado indica ausencia de nucleosomas. Ac, Acetilos. Figura adaptada de Carey y col., 2015

Los ARNm así como las proteínas de TFAP2C y SMARCA4, fueron detectados en cultivos de células madre trofoblásticas murinas y se demostró el rol fundamental que cumplen ambos factores en el mantenimiento de estas células (Kidder y Palmer., 2010).

El desarrollo adecuado de los linajes de MCI y TE es crítico para asegurar el éxito de la implantación embrionaria, la placentación y el desarrollo a término. Las alteraciones en el patrón de expresión, que dan lugar al desarrollo anormal del trofoblasto, se ven asociadas a fallas de implantación y desarrollo anormal de la placenta que derivan, con alta frecuencia, en la pérdida de la gestación. Por esto, comprender los mecanismos que gobiernan la diferenciación celular en embriones tempranos resulta fundamental para
diagramar nuevas estrategias que permitan la producción de embriones con alto potencial para generar y mantener una preñez y, con ello, reducir pérdidas económicas relacionadas con pérdidas gestacionales. No menos importante sería el uso como modelo para trasladar los conocimientos adquiridos a fallas implantatorias en humanos.

## 1.2. Biotecnologías reproductivas en el bovino

Las biotecnologías de la reproducción comprenden técnicas de reproducción asistida (ART, del inglés "Assisted reproductive techniques") que intentan maximizar la producción de embriones de alto valor, a través de la optimización de los procesos biológicos resumidos anteriormente y/o su imitación y explotación *in vitro*. A nivel productivo, las ART han permitido reducir los tiempos generacionales para el mejoramiento genético bovino, impactando de manera positiva en la producción de leche y carne. Además, la combinación de las ART con las técnicas de análisis y manipulación genética abrió las puertas para la genotipificación y selección de embriones específicos o la producción de animales modificados genéticamente para su uso como bioreactores o modelos biológicos para el estudio de enfermedades (Revisado por Loi y col., 2016).

Las técnicas de ART varían ampliamente en cuanto a complejidad y, por lo tanto, aplicación. La técnica menos compleja, más antigua y más ampliamente utilizada en producción bovina es la inseminación artificial (IA), que consiste en depositar el semen directamente dentro del aparato reproductor femenino y en el momento adecuado para la fecundación, permitiendo maximizar el uso de un eyaculado y la genética de toros de elite (Revisado por Moore y Hasler, 2017). Al esclarecerse los mecanismos y las hormonas que regulan el ciclo estral de la hembra bovina, fueron diseñados protocolos muy eficientes para la sincronización del ciclo estral del rodeo, lo que permitió aplicar la IA a tiempo fijo (IATF, revisado por Colazo y Mapletoff, 2013), independizándose entonces de la detección de celo de forma individual y, por lo tanto, simplificando notablemente la técnica. La criopreservación de semen, en conjunto con la IA, permitió trasladar y extender la genética de toros de elite a través de la comercialización de las dosis seminales congeladas, lo que se tradujo en un incremento de la selección de la genética paterna y de la capacidad reproductiva de estos machos selectos, además de una reducción de la transmisión de enfermedades sexuales y de los costos de trasporte (Dekkers, 1992; Revisado Verma y col., 2012). Por otro lado, con la manipulación tanto del desarrollo folicular como de las ondas foliculares fue posible diseñar protocolos de superovulación (SOV), es decir procedimientos de estimulación hormonal aplicados para obtener múltiples oocitos maduros por onda folicular, en lugar de un único oocito (Umbaugh y col., 1951). Esto significó la posibilidad de incrementar la selección de la genética materna (además de la paterna, con la IA) a través de la SOV, seguida de la IA y la recuperación de los embriones producidos mediante el lavado uterino a día 7 del inicio del celo. Estos embriones producidos in vivo pueden ser luego transferidos a hembras sincronizadas de bajo valor genético y/o económico, llamadas hembras receptoras, que lleven adelante la preñez mientras que las hembras de elite continúan en los programas de multiovulación y transferencia de embriones (MOET del inglés "multi ovulation and embryo transfer") (Umbaugh y col., 1951; Bó y col. 2012). De esta forma, la MOET permite multiplicar el número de crías por hembra que, de forma natural y en las mejores condiciones, sólo generarían una cría por año (Seidel G Jr., 1981). Con los protocolos desarrollados para la criopreservación de embriones se accedió a la comercialización de embriones producidos in vivo, facilitando tanto el traslado de genética bovina de alto valor como el mejoramiento genético de los rodeos a través de ambos progenitores, además de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades (Villar y col., 1991; Revisado por Alberio, 2008).

En los últimos años se han realizado numerosos avances en el campo de la biotecnología reproductiva. Al conocerse los mecanismos moleculares que intervienen en la capacitación espermática y la maduración oocitaria, se lograron imitar las condiciones necesarias para llevar a cabo estos procesos de forma exitosa en el laboratorio (Gilchrist y col., 2007; revisado por Parrish y col., 2014). El desarrollo de medios de cultivo capaces de proporcionar un ambiente adecuado para el mantenimiento del desarrollo embrionario, permitió finalmente la producción de embriones totalmente *in vitro* (PIV). Las técnicas de PIV de embriones son muchas y diferentes, pero en todos los casos son más complejas que las empleadas en la producción de embriones *in vivo*, por lo que requieren personal capacitado así como disponibilidad de equipamiento sofisticado. Sin embargo, estas técnicas no solo permiten la producción masiva y de forma menos costosa de embriones con mérito genético, sino que también permiten la aplicación de otras técnicas biotecnológicas como el sexado, análisis genético y/o la edición génica de embriones, proveyendo una plataforma tecnológica para la selección y producción de animales excepcionales.

La técnica de PIV más utilizada es la fecundación in vitro (FIV), que consiste en la coincubación in vitro de las gametas femeninas y masculina (las que fueron previamente maduradas y capacitadas *in vitro*) para generar los cigotos, y el posterior cultivo *in vitro* de éstos hasta el estadio de blastocisto, momento en el que pueden ser transferidos al útero de receptoras sincronizadas de manera no-quirúrgica (revisado por Parrish y col., 2014). Actualmente, en el sistema productivo ganadero, la FIV se usa ampliamente gracias a la disponibilidad de semen congelado de toros de elite y de oocitos recuperados de vacas en pie de alto valor genético. La recuperación de oocitos de vacas vivas se realiza actualmente por aspiración de los folículos vía transvaginal y de forma no quirúrgica, guiada por ultrasonografía (Pieterse y col., 1991; Backer y col., 1996). Esta técnica, conocida como "Ovum pick up" (OPU), tiene la ventaja de poder realizarse de forma repetitiva en el mismo animal e incluso en vacas prepúberes, gestantes o añosas (Kruip y col., 1994). La OPU y la maduración in vitro de los oocitos recuperados (MIV), seguida por el protocolo de FIV y transferencia embrionaria, permitió duplicar (sino triplicar) la producción de embriones respecto de la MOET (Humblot y col., 2010; Revisado por Verma y col., 2012) y hoy representa uno de los principales sistemas de producción de embriones bovinos en Brasil y Argentina (IETS, 2018).

Otra de las técnicas para la PIV de embriones es la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI, del inglés "*intracitoplasmic sperm injection*") que consiste en la inyección de un único espermatozoide en el citoplasma de un oocito maduro, con la ayuda de un micromanipulador. Esta técnica maximiza el uso de la dosis seminal, lo que resulta interesante para producir embriones a partir de semen sexado de alto valor económico. Además, permite la producción de embriones *in vitro* en algunas especies en las cuáles la FIV no funciona (ejemplo de esto es la especie equina). Sin embargo, la eficiencia de la ICSI en bovinos es muy baja (Canel y col., 2018; Salamone y col., 2017) y requiere de personal muy capacitado y equipamientos costosos, lo que lleva a que actualmente no se la utilice de forma masiva en el área productiva, sino más bien para casos puntuales y para investigaciones en producción de animales editados o el estudio de los mecanismos de fertilización (Kurokawa y Fissore, 2003; Pereyra-Bonnet y col., 2008; Canel col., 2018; Salamone y col., 2017).

Finalmente, la clonación bovina es una estrategia altamente compleja pero con gran potencial tanto en el área académica como productiva, que permite generar copias genéticamente idénticas de animales valiosos. La técnica de clonación y particularmente una de sus variantes empleada en esta tesis, se describirá en detalle a continuación.

### 1.2.1. Clonación por trasplante nuclear de célula somática

En biología de la reproducción, "Clon" (del griego,  $\kappa\lambda\omega\nu$ : 'retoño, rama') es un término empleado para denominar al conjunto de células u organismos genéticamente idénticos, originados por reproducción asexual a partir de una única célula u organismo o por división de embriones en estados iniciales del desarrollo (adaptado de Real Academia Española - Diccionario de la lengua española,  $22^a$ edición). Así, la disgregación de blastómeras previo al proceso de compactación o la bisección de mórulas o blastocistos son técnicas que permiten la producción de gemelos monocigóticos *in vitro* (clones). Éstas se adaptaron para su uso en mamíferos en torno a los años 80s (Ozil y col., 1982; Moustafa y Hahn, 1978) y han sido aplicadas tanto a bovinos y ovinos, aunque con muy baja eficiencia (Hashiyada, 2017).

Una variante más sofisticada para la producción in vitro de clones es la clonación por transferencia nuclear (TN). Brevemente, la TN implica la enucleación de un oocito maduro seguido por la fusión o invección del ooplasto con una célula que brindará la información genética del futuro animal. Para lograr el desarrollo embrionario, el embrión reconstruido es estimulado artificialmente mediante tratamiento químico o físico, proceso denominado "activación", que induce un aumento en el Ca<sup>+2</sup> intracelular, simulando la fusión del espermatozoide. Originalmente la TN fue desarrollada en anfibios por Briggs y King (1952), quienes inyectaron blastómeras en oocitos enucleados de rana, y perfeccionada luego por Gurdon y colaboradores (1962), quienes lograron producir renacuajos clonados empleando células somáticas diferenciadas como donantes de núcleo. Estos trabajos pioneros despertaron interés en el mundo científico ya que demostraron por primera vez que el núcleo de una célula somática completamente madura aún contiene la información genética necesaria para desarrollar un organismo completo y, además, que la diferenciación y especialización celular son reversibles (Gurdon y col., 1962). Décadas más tarde, McGrath y Solter reportaron que en mamíferos la clonación por TN resultaba exitosa sólo si se usaba el núcleo de un cigoto o de un embrión de 2 células como donante, mientras que era imposible obtener clones a partir de células más diferenciadas (McGrath y Solter, 1983). Esta idea, si bien perduró por años, fue refutada por Willadsen, quién logró producir clones ovinos reconstruidos a partir de blastómeras

de embriones más avanzados (Willadsen y col., 1986). Posteriormente, otros autores reconfirmaron lo reportado por Willadsen mediante la producción de clones de múltiples especies, en condiciones similares (Revisado por Niemann y col., 2013). Una década más tarde, fue publicado el nacimiento de 2 clones ovinos, Morag y Megane, producidos por fusión de oocitos enucleados con células embrionarias que fueron cultivadas *in vitro* por 6 a 13 pasajes y sincronizadas previo a su utilización como donantes (Campbell y col., 1996). Finalmente, la potencialidad de células somáticas totalmente diferenciadas para su uso como donantes de núcleo por clonación fue confirmada con el del nacimiento de Dolly, el primer clon reconstruido a partir de células somáticas adultas cultivadas *in vitro*, uno de los eventos más revolucionarios tanto a nivel científico como social de los últimos años (Wilmut y col., 1997).

Actualmente, y acompañado por el gran avance genético y biotecnológico de la última década, la transferencia nuclear de célula somática (SCNT, del inglés "Somatic cell nuclear trasfer") se ha convertido en una tecnología con gran potencial tanto a fines de investigación básica como aplicada, así como a nivel comercial. Esta técnica permite la desdiferenciación de una célula somática en un cigoto, con potencial para dar lugar a un nuevo animal. Las posibilidades que brinda la SCNT la han convertido en la técnica por excelencia para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la reprogramación celular y pluripotencia (Niemann y col., 2016). Asimismo, puede utilizarse para rescatar genéticamente animales de edad avanzada, con problemas reproductivos o, incluso, recientemente muertos (Hoshino y col., 2009). En este sentido, en conjunto con proyectos de criopreservación de células y establecimiento de bancos genéticos, la SCNT es una herramienta con gran potencial para los programas de conservación de especies amenazadas (Hong y col., 2011; Moro y col., 2012). Otras aplicaciones comprenden la producción de animales transgénicos con genotipos totalmente novedosos tanto para la industria pecuaria (resistencia a enfermedades, mejora de calidad de productos), como para la industria farmacéutica (proteínas recombinantes de alto valor) o la biomedicina (modelos animales y órganos para xenotransplante). Finalmente, dada la posibilidad de producir un embrión del que derivar células madre embrionarias, el atractivo de la SCNT para la medicina regenerativa es invaluable.

A la fecha, muchos laboratorios han empleado la SCNT logrando clonar más de 20 especies de mamíferos (Wilmut y col., 2002; Revisado por Niemann y col., 2013, Rodriguez-Martinez, 2012). Sin embargo, la eficiencia de la técnica continúa siendo extremadamente baja y los mecanismos moleculares que dirigen la reprogramación celular aún permanecen sin esclarecerse, lo que limita el uso de la técnica (Wilmut y col., 2002; Vajta y col., 2007). Particularmente en bovinos, la tasa de producción de blastocistos clonados no supera el 30% mientras que el porcentaje de crías viables obtenidas por SCNT es menor al 15% sobre el total de embriones transferidos (Revisado por Chavatte-Palmer y col., 2012), muy por debajo del 50% reportado para la producción de terneros por FIV. El 60% de las pérdidas embrionarias ocurren previo a la implantación y se observa una alta frecuencia de pérdidas gestacionales en el primer trimestre de gestación (Hill y col., 2000; Heyman y col., 2002, Smith y col., 2012). En aquellos casos en los que se superan los 90 días de gestación, frecuentemente se observan anomalías en el desarrollo fetal de los clones que resultan en malformaciones pulmonares, cardíacas y hepáticas, desarrollo anormal del cordón umbilical y sobre-crecimiento fetal, patologías normalmente resumidas como "síndrome de la cría grande" (LOS, del inglés "large offspring sindrome", Campbell y col., 2005; Kruip y col., 1997; Han y col., 2003; revisado por Chavatte-Palmer y col., 2012). En general, las pérdidas gestacionales, así como las deficiencias en el desarrollo fetal (LOS) han sido estrechamente asociadas a fallas en la placentación y patologías de la placenta durante la gestación (Balbach y col., 2010; Young y col., 1998). La comparación de los tejidos extraembrionarios (Degrelle y col., 2012) o de las placentas desarrolladas por la transferencia de embriones de SCNT respecto de aquellas desarrolladas por la gestación de embriones de IA revela una marcada desregulación en el desarrollo de las primeras que se evidencia en aberraciones morfológicas y bioquímicas (Aston y col., 2010). Muchos trabajos indican que las anomalías en el desarrollo de la placenta se deben a una proliferación y/o diferenciación aberrante de las células del trofoblasto, precursoras de la porción fetal de la placenta, durante el desarrollo embrionario preimplantatorio (Chavatte-Palmer y col., 2012; Knott y Paul, 2014; Balbach y col., 2010). El análisis por RTqPCR y/o microarray de embriones preimplantatorios clonados de múltiples especies, muestra que el patrón de trascripción de genes clave para el desarrollo es aberrante respecto del de embriones producidos por fertilización in vitro (FIV) en condiciones similares (Wrenzycki y col., 2002; Matoba y col., 2011; Moro y col., 2015; Matoba y col., 2014; Boiani y col., 2003; Zhang y col., 2016; Buemo y col., 2016; Bui y col., 2009; Degrelle y col., 2012) o incluso de embriones producidos *in vivo* (Wrenzycki y col., 2005). Se cree que esta diferencia se debe principalmente a una reprogramación incompleta de la célula donante, en la que las marcas epigenéticas que dan identidad a la célula somática no son correctamente eliminadas por la maquinaria del oocito y, por lo tanto, no se logra la expresión adecuada en tiempo y espacio de los factores de transcripción necesarios para dirigir el desarrollo normal de un embrión y su diferenciación a MCI y TE. Se han reportado niveles de metilación elevados en el ADN de mórulas y blastocistos bovinos producidos por SCNT, apoyando la hipótesis de la reprogramación nuclear ineficiente (revisado por Reik y col., 2001 y por Niemann y col. 2013). De todas formas, aquellos clones que logran superar la gestación y el período neonatal son indiferenciables morfológica y fisiológicamente respecto de animales producidos *in vivo* (Chavatte palmer y col., 2002, revisado por Cibelli y col., 2012 y por Niemann y col. 2013).

Diferentes estrategias han sido desarrolladas para incrementar la eficiencia de la clonación por SCNT. Un gran progreso se obtuvo al simplificar la técnica de clonación trabajando con embriones libres de ZP. Así, luego del tratamiento de los oocitos maduros con enzimas proteolíticas, la enucleación de los oocitos (ahora libres de ZP) se vio facilitada, como también la fusión de la célula y el ooplasto mediante un pulso eléctrico (Oback y col., 2003). También se ha evaluado el uso de diferentes tipos de células somáticas y con distinto grado de diferenciación, como donantes de núcleo, con resultados contradictorios (revisado por Niemann y col., 2013). Incluso se ha demostrado en bovinos que diferentes líneas de fibroblastos obtenidas a partir del mismo tejido tienen distinta capacidad de producir blastocistos por SCNT (Poehland y col., 2007; Degrelle y col., 2012). Sumado a esto, no puede desestimarse el efecto de la gran variabilidad en los oocitos bovinos, ya sean provenientes de vacas en pie o recuperados de ovarios de matadero, sobre su capacidad para reprogramar el núcleo donante (Oback, 2009). También se ha evaluado el tratamiento previo de las células donantes con drogas modificadoras de la epigenética, en busca de mejorar la reprogramación nuclear (Gonzalez-Munoz y Cibelli, 2018). Sin embargo en la mayoría de los trabajos los resultados no son muy alentadores ya que, si bien con algunas de ellas se detecta una leve mejora, es a expensas del riesgo de modificar regiones críticas del ADN en las que se ha demostrado que las marcas epigenéticas son necesarias, ya que es imposible predecir con precisión el efecto de estas drogas (Enright y col., 2003; revisado por Gonzalez-Munoz y Cibelli, 2018). En vista de la creciente disponibilidad de técnicas para el análisis genómico, epigenómico y transcriptómico y gracias a la disminución de sus costos, resulta probable que en los próximos años los investigadores dispongan de un mapa completo de aquellos factores que afectan la eficiencia de la SCNT y, en consecuencia, sea posible diseñar estrategias para superar aquellos problemas de manera eficiente y precisa.

El gran potencial que tiene la SCNT es innegable, sin embargo la baja eficiencia de la técnica y las anomalías reportadas, junto con la crítica social, son una gran limitante para su utilización. Resulta entonces clave profundizar los conocimientos actuales respecto de la SCNT, para desarrollar protocolos confiables de selección de células donantes o tratamientos precisos para los embriones que permitan perfeccionar la técnica con el fin último de mejorar las tasas de clones nacidos vivos para así así poder extender el uso de la técnica tanto en el área académica como aplicada.

## 1.3. Células madre

Se define como células madre a aquellas células que tienen capacidad de autorreplicarse de manera indefinida y que, bajo las condiciones adecuadas, pueden diferenciarse a diversos linajes celulares (Revisado por Donovan y Gearhart, 2001).

Las células madre pueden clasificarse según su potencial de diferenciación en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (Figura 1.6, revisado por Wagers y Weissman, 2004). La fusión del espermatozoide y el oocito maduro dan lugar a la formación del cigoto, a partir del cual se desarrollará el embrión y los tejidos extraembrionarios que darán soporte a la gestación. Esta célula se define entonces como totipotente (del latín *totus*, completo), ya que tiene el potencial para diferenciarse en todos los tipos celulares posibles. Más adelante en el desarrollo y luego de la primer diferenciación es posible diferenciar 2 linajes celulares, el MCI que originará todos los tejidos embrionarios y el TE que dará lugar a los tejidos extraembrionarios, tal como se describió anteriormente. Las células del MCI se consideran células madre pluripotentes (*plures*, en latín muchos o varios) capaces de originar linajes celulares de las 3 capas embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo). Las células madre multipotentes, son aquellas que pueden diferenciarse en linajes celulares relacionados a una única capa embrionaria. Finalmente, las células unipotentes son aquellas que se diferencian solo en

células relacionadas a un único linaje celular, ejemplo de estas son las células hematopoyéticas. Actualmente esta clasificación se volvió controversial ya que se ha demostrado que mediante inducción física o química es posible diferenciar células multipotentes a linajes correspondiente a otras capas embrionarias, distintas a las de su origen, fenómeno que fue definido como "plasticidad celular" o "transdiferenciación" (Wagers y Weissman, 2004; Rutenberg y col., 2004; revisado por Rodríguez-Pardo VM, 2005).

Otra posibilidad es clasificar a las células madre según el tejido de origen en células madre embrionarias o células madre adultas, como se describirá a continuación.

## 1.3.1. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESC, del inglés "*Embryonic Stem Cells*") son células pluripotentes que derivan del MCI de blastocistos tempranos, usualmente producidos *in vitro*. Estas células presentan expresión de factores de pluripotencia, tales como *OCT4*,



**Figura 1.6. Esquema de diferenciación celular basado en el paisaje de Waddington.** El cigoto totipotente (amarillo) comenzará a diferenciarse originando células pluripotentes del MCI (naranja). Éstas a su vez derivarán en células más especializadas y con menor plasticidad como son las células multipotentes de las capas embrionarias (celeste y verde) y finalmente células unipotentes que se diferenciará en un único linaje celular (negro, rosa, marrón y violeta).

NANOG y SOX2 (Loh y col., 2006; revisado por Nowak-Imialek y Niemann, 2013). En cultivo *in vitro*, estas células se diferencian espontáneamente en estructuras multicelulares conocidas como "cuerpos embrionarios", que contienen elementos de las

tres capas germinales (revisado por Blomberg y Telugu, 2012). Para mantener el estado pluripotente de forma indefinida, las ESC son usualmente cultivadas en presencia de citoquinas y factores de crecimiento específicos que impidan su diferenciación (Nagy y col., 1993). Al ser inyectadas en blastocistos, estas células contribuyen a la formación de todos los tejidos embrionarios, mientras que al ser inyectadas de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes *nude*, son capaces de generar teratomas (Bradley y col., 1984; Odorico y col., 2001; Shamblott y col., 1998).

La disponibilidad de ESC en especies domésticas se vio entorpecida por la dificultad para su aislamiento y cultivo. Los primeros cultivos de ESC se establecieron a partir de blastocistos de ratón en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981) y 17 años más tarde se reportó el aislamiento y cultivo de ESC humanas (Thomson y col., 1998). En especies domésticas y particularmente en bovinos se han evaluado diferentes protocolos y alternativas de cultivo con poco éxito, ya que las células aisladas, si bien presentan morfología similar a las ESC murinas o humanas, muestran auto renovación limitada y pérdida de marcadores de pluripotencia luego de sucesivos pasajes (Soto y Ross, 2016; revisado por Nowak-Imialek y Niemann, 2012). Se supone que las diferencias en los métodos y requerimientos de las ESC murinas, humanas y bovinas responden, precisamente, a las diferencias entre los tiempos de desarrollo embrionario, morfología y expresión de genes que son específicos de especie, por lo que debe establecerse un protocolo que se adapte a cada una de ellas. Recientemente, casi 40 años después del primer aislamiento de ESC murinas, fue reportado el aislamiento y cultivo de ESC bovinas de forma exitosa, lo que representa un avance importante a nivel académico y clínico, dado su potencial uso en el área de la medicina regenerativa y/o clonación animal (Bogliotti y col., 2018).

Es importante destacar que en la especie humana el uso de embriones para derivar ESC resultó en una gran controversia debido principalmente a consideraciones éticas, por lo que su utilización está considerablemente restringida.

### 1.3.2. Células madre adultas

Las células madre mesenquimales (MSC, del inglés "*Mesenchymal Stem Cells*") son células adultas multipotentes, que presentan capacidad para autorenovarse indefinidamente y diferenciarse completamente, *in vivo* e *in vitro*, hacia aquellos tipos celulares de origen mesodérmico tales como osteocito, condrocito y adipocito (Liechty y

col., 2000; Uccelli y col., 2008) (Figura 1.7). Las MSC se originan en el mesodermo embrionario, una de las tres capas germinales de un embrión temprano y se postula que estas células migran y colonizan diferentes tejidos donde cumplen la función de renovación celular. Algunos autores aseguran que las MSC pueden transdiferenciarse en otros linajes celulares, entre ellos el epitelial y muscular, aunque su diferenciación *in vivo* es aun objeto de controversia (Uccelli y col., 2008) ya que al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes *nude* de forma subcutánea no da lugar a la formación de teratomas.

Si bien las MSC fueron tradicionalmente aisladas de médula ósea, hoy se sabe que residen en el tejido conectivo de múltiples órganos, donde participarían del mantenimiento y regeneración tisular (Young y col., 1995; Revisado por Kalervo Väänänen 2005). Se han aislado exitosamente MSC de tejidos fetales y adultos, entre ellos placenta, líquido amniótico, cordón umbilical, fluido sinovial, tejido adiposo, hígado y músculo (Revisado por Barba y col., 2013). El tejido adiposo presenta ventajas importantes como fuente de MSC por tratarse de un tejido muy abundante, no temporal (como la placenta) y cuya extracción implica un procedimiento simple y de invasión mínima comparado con el aislamiento de medula ósea o músculo (Kern y col., 2006).

Las MSC no constituyen una población celular homogénea. Aunque todos los cultivos muestran capacidad de autorenovación y multidiferenciación, se han reportado diferencias en cuanto a la morfología y plasticidad de las MSC dependiendo de la especie y del tejido a partir de los cuáles las MSCs son aisladas (Young y col., 1995). Además, fue demostrado que el potencial de diferenciación *in vitro* disminuye significativamente con los sucesivos pasajes, posiblemente debido a senescencia (Izadpanah y col., 2008; Bonab y col., 2006; Halfon y col., 2011).

Pese a que en la actualidad el aislamiento y uso de MSC se ha popularizado, a la fecha no existe una característica única de estas células que permita identificarlas de forma precisa. Por esto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés *"Internacional Society for Cellular Therapy"*) propuso 3 criterios de identidad mínimos que deben cumplirse, en muestras humanas, para poder definir a una célula como "célula madre mesenquimal". Estos criterios consisten en: 1- Probar la adherencia al plástico y morfología fibroblastoide; 2- Determinar la presencia de los marcadores de superficie específicos CD105, CD73 y CD90, en ausencia de marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD14 y 3- Confirmar el potencial de diferenciación hacia linajes mesodérmicos,



**Figura 1.7. Esquema resumido de la capacidad multipotente de las células MSC.** Las flechas continuas indican la capacidad de las MSC para formar células derivadas de mesodermo. Las flechas punteadas dan cuenta de la controversial capacidad para derivar células de origen endo y ectodérmico. Imagen adaptada de Uccelli y col., 2008.

tales como osteocitos, adipocitos y condrocitos, empleando inductores en el medio de cultivo. Debido a la gran variabilidad entre subpoblaciones de MSC, además de los antígenos propuestos por ISCT, otros autores proponen incluir marcadores como STRO-1, CD44 y CD166 para la tipificación de células mesenquimales de otras especies (Halfon y col., 2011). De todas formas, los criterios establecidos sirven de referencia para perfeccionar los protocolos de aislamiento y determinar las mejores fuentes de MSC en animales domésticos.

La plasticidad, capacidad inmunomoduladora y facilidad de aislamiento y cultivo *in vitro*, tornan a las MSC como interesantes candidatas para su uso en biotecnologías de

avanzada. Las MSC se han empleado en modelos experimentales e incluso en la clínica para regenerar heridas de piel y lesiones en hueso, cartílago y miocardio (Petite y col., 2000; Uccelli y col., 2008; Locatelli y col., 2015, Barba y col., 2013). En clonación, previamente fue reportado que el uso de células madre embrionarias mejora considerablemente el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones, posiblemente porque su gran plasticidad simplifique el proceso de reprogramación celular. En este sentido, por sus características de células madre multipotentes, las MSC resultan una excelente opción para la clonación de animales adultos con fenotipos deseados. A la fecha se han reportado clones nacidos, producidos a partir de MSC de las diversas especies domésticas como bovina, porcina, canina y equina (da Silva y col., 2016; Oh y col., 2011; Faast y col., 2006; Olivera y col., 2016, Olivera y col., 2018).

Pese al gran potencial que presentan las células mesenquimales, la falta de consenso respecto a los métodos para su aislamiento de animales domésticos, así como la gran variabilidad reportada en cuanto a las características de los cultivos obtenidos, entorpecen su utilización tanto en clínica como en investigación. Por todo esto, resulta esencial estudiar y estandarizar los protocolos de aislamiento de MSC de animales domésticos, priorizando sobre todo la sencillez y el bajo costo de los mismos, y establecer una correcta identificación de las mismas, para extender su uso tanto en el área académica como aplicada.

## 1.4. Agregación embrionaria

Los primeros trabajos que reportan la agregación embrionaria fueron realizados en la década del 60 empleando embriones murinos, con la finalidad de estudiar la tolerancia inmunológica y la formación de quimeras (Tarkowski y col., 1961; Mintz y col., 1962a, Gardner, 1968). Inicialmente la agregación embrionaria (AE) consistía en la microcirugía de 2 embriones, para ubicar las blastómeras dentro de una misma microgota y en estrecho contacto de forma que ambas contribuyan a la formación de un único blastocisto final. La técnica fue luego simplificada al utilizar digestión enzimática para remover la ZP y realizar la agregación sencillamente ubicando los embriones en íntimo contacto durante el cultivo *in vitro*, sin uso de equipamiento sofisticado (Mintz y col., 1962a y Mintz y col., 1962b). La AE se adaptó como estrategia para producir quimeras transgénicas al agregar embriones con células madres modificadas genéticamente, e incluso se propuso

como un método para la generación de quimeras interespecíficas con nacidos vivos (Rossant y Frels; 1980; revisado por Prather y col., 1989).

En clonación, Boiani y colaboradores emplearon por primera vez la agregación embrionaria y lograron de esta forma corregir la expresión temporal y espacial de OCT4, además de lograr un aumento en el potencial de desarrollo in vivo de clones murinos (Boiani y col., 2003). En este caso, la AE consistió en el cultivo en íntimo contacto de 2 o más embriones libres de ZP ubicados en pequeñas depresiones en la placa de cultivo. Este sistema de cultivo, denominado "well of the well" (WOW) fue diseñado por Vajta y colaboradores y consiste en pequeños micropozos realizados en la base de la placa con un punzón caliente, todos cubiertos por una gota de medio de cultivo y, finalmente, por aceite mineral (Figura 1.8, Vajta y col., 2000). Fue propuesto como una forma de individualizar el cultivo de embriones, ya que cada embrión se ubica en un único micropozo, pero permitiendo la estimulación mutua entre ellos al compartir el medio de cultivo y factores parácrinos. La estrategia resultó particularmente útil para el cultivo de embriones libres de ZP al brindar contención física a las blastómeras durante el desarrollo embrionario temprano, lo que facilita la compactación del embrión. El empleo de esta estrategia de cultivo resultó muy interesante en la producción de clones agregados libres de ZP, ya que los embriones son prácticamente idénticos a nivel genómico, pero existen diferencias a nivel epigenético, debido principalmente a la reprogramación independiente de cada célula donante (Boiani y col., 2002; Park y col., 2002). De hecho, Boiani y colaboradores sugieren que la mejora en la calidad y desarrollo a término de los clones agregados se debe principalmente a una compensación de las posibles fallas en la reprogramación, dada por la contribución de más de un embrión al blastocisto final.



**Figura 1.8. Sistema** *well of the well*, **para el cultivo de embriones libres de ZP**. (A) Punzón empleado para realizar los micropozos (escala 100 µm). (B) microfotografía de micropozos (magnificación 25x). Imagen de Vajta y col., 2000.

La agregación embrionaria fue rápidamente empleada para la clonación de múltiples especies y se reportaron importantes beneficios de su aplicación. Puesto que los embriones clonados ya sea de ratón, conejo, bovino o cerdo poseen menor cantidad de células que los embriones de FIV o producidos in vivo (Chung y col., 2002; Chesne y col., 2002; Koo y col., 2002; Koo y col., 2000), la AE se propuso como una estrategia para aumentar la cantidad de células de los embriones en desarrollo. En este sentido, Ribeiro y colaboradores demostraron que el incremento del volumen del embrión, ya sea por fusión o por agregación, incrementa el potencial de desarrollo y la densidad celular del blastocisto (Ribeiro y col., 2009). En ratones, se demostró que la AE aumenta la media del número de células por blastocisto, mejora el desarrollo in vivo y normaliza la expresión de genes asociados a la pluripotencia (Balbach y col., 2010). En bovinos, la agregación de clones producidos por "Hand Made Cloning" (HMC) mejoró el desarrollo *in vitro* de los embriones, mientras que otros autores, si bien no reportan mejoras en la tasa de blastocisto sí demuestran mejoras en la calidad y desarrollo in vivo de los clones bovinos de SCNT producidos por agregación (Pedersen y col., 2005; Zhou y col., 2008; Ribeiro y col., 2009; Misica-Turner y col., 2007; Bang y col., 2015).

En nuestro laboratorio se utilizó exitosamente la estrategia de AE para mejorar la eficiencia de producción de clones porcinos, equinos y felinos homo y heteroespecíficos (Gambini y col., 2012; Gambini y col., 2014; Moro y col., 2015; Buemo y col., 2016). En equinos, la agregación de embriones mejoró el desarrollo *in vitro*, la tasa de preñez y de animales nacidos y se reportó que el incremento de las tasas de blastocistos era lineal con respecto al número de estructuras agregadas (Gambini y col., 2014). Es importante destacar que esta correlación positiva entre el número de estructuras agregadas y el desarrollo embrionario no implicó el uso de mayor número de embriones, dando un soporte sólido al uso de la AE en clonación. El trabajo de agregación embrionaria en equinos resulto en el primer clon equino viable de América Latina (Gambini y col., 2012). Además, la agregación de clones felinos ha demostrado mejorar el desarrollo de los embriones y normalizar la expresión de genes clave en el desarrollo y la diferenciación celular (Moro y col., 2015). Finalmente, la técnica de AE aplicada a la clonación porcina derivó no solo en una mayor tasa de blastocistos sino también en la producción de embriones de mejor calidad y mayor tamaño (Buemo y col., 2016).

#### 1.5. Sistema CRISPR/Cas9

En los últimos años se han desarrollado novedosas herramientas de biología molecular, como son las nucleasas programables sitio-específicas, capaces de inducir modificaciones puntuales en secuencias específicas del genoma, que presentarían gran potencial para el estudio de los mecanismos involucrados en la diferenciación al linaje del TE, principalmente en aquellas especies en las que manipulación de genoma era tradicionalmente laborioso y poco eficiente, como es el bovino.

Las nucleasas con dedos de cinc (ZFNs, del inglés "Zinc-finger nucleases") y las nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción (TALENs, del inglés "Transcription activator-like effector nucleases"), fueron las primeras en ser introducidas como herramientas para la edición de ADN y han mostrado ser eficientes al utilizarlas en células y embriones de mamíferos (Santiago y col., 2008; Hauschild y col., 2011; Yang y col., 2011; Yu y col., 2011; Carlson y col., 2012; Bedell y col., 2012; Proudfoot y col., 2015). Éstas surgieron del estudio de la enzima de restricción FokI, la cual tiene físicamente separadas las actividades de corte y de unión o reconocimiento del ADN (Li y col., 1992). Tanto ZFN como TALEN se forman por fusión del dominio nucleasa FokI no específico, que catalizará la escisión del ADN, y un dominio de reconocimiento de ADN que es específico para el gen blanco que se quiere manipular. A pesar de su alta eficiencia, su diseño es laborioso y altamente costoso (Van der Oost y col., 2013), por lo que resultan inaccesibles para la mayoría de los laboratorios. Asimismo, considerando que la especificidad está dada por la interacción proteína-ADN, debe diseñarse una enzima específica para cada gen que desea modificarse, lo que implica otra gran limitante para su aplicación y, además, el reconocimiento no puede predecirse con precisión (Jullierat y col., 2014).

Más recientemente, fue reportado un nuevo sistema de edición génica basado en un sistema de inmunidad adquirida de procariotas, llamado CRISPR-Cas9 (del inglés, *"Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Cas9*", Mojica y col., 2005; Jinek y col., 2012; Cong y col., 2013). Desde su aparición, este sistema ha sido utilizado de forma rápida, fácil y eficiente para la edición del genoma de distintos organismos (Wang y col., 2013; Seruggia y Montoliu, 2014; Mali y col., 2013a; Crispo y col., 2015; Bevacqua y col., 2016). Brevemente, esta herramienta consiste en un ARN guía de cadena simple (sgRNA) que dirige a la nucleasa Cas9 al sitio blanco en el genoma, por

complementariedad de bases (Jinek y col., 2012). Este ADN blanco debe estar ubicado próximo a una secuencia conocida como PAM (5'-NGG-3') que será la señal para inducir un corte en el ADN (Figura 1.9, Bolotin y col., 2005). La principal ventaja del sistema de CRISPR/Cas9 sobre las otras tecnologías nucleasas radica en la posibilidad de editar diferentes secuencias de ADN sencillamente cambiando una secuencia de 20 pb del sgRNA, siendo la misma enzima Cas9 adecuada para todas las secuencias. Esto vuelve al sistema CRISPR/Cas9 una herramienta sumamente versátil y económica. Su uso, además, se vio facilitado por la empresa *Addgene*, que permite el acceso a una gran cantidad de herramientas para aprovechar el sistema CRISPR-Cas9.

Posteriormente al corte sitio-específico inducido por Cas9, el mismo será reparado por la propia maquinaria celular, existiendo la posibilidad de introducir pequeñas mutaciones en la secuencia que lleven a un corrimiento en el marco de lectura y consecuente a la pérdida de la función génica (KO, del inglés "*Knock out*"). Alternativamente, si junto con el sistema CRISPR/Cas9 se provee de un "ADN donor" con homología a las secuencias lindantes al sitio de corte, la reparación de la ruptura podrá ser mediada por reparación dirigida por homología y dará lugar a la generación de mutaciones puntuales y precisas o la incorporación de transgenes (Joung y Sander, 2013).



**Figura 1.9. Esquema del sistema CRISPR/Cas9.** El complejo formado por la nucleasa Cas9 (amarillo) y el sgRNA se une por complementariedad de bases (verde) a un sitio específico en el genoma, que se encuentra inmediatamente seguido de una secuencia PAM (NGG), para inducir un corte doble hebra en el ADN.

En nuestro laboratorio hemos evaluado el uso del sistema CRISPR/Cas9 para producir modificaciones en el gen PRNP, codificante del prion causante del "mal de la vaca loca", tanto en células somáticas como en embriones bovinos de FIV, con alta eficiencia (Bevacqua y col., 2016). Este trabajo fue declarado de interés por la Honorable Cámara de Diputados de la Nación, en 2016.

### 1.5.1. Modulación de expresión génica mediada por CRISPR/dCas9.

Mediante ingeniería genética se logró obtener una versión inactiva de la nucleasa Cas9 dando lugar a una proteína programable sin función catalítica pero con capacidad de reconocimiento y unión a sitios específicos del ADN, llamada dCas9 (del inglés *"dead-Cas9"*). La dCas9 fue luego fusionada a diferentes dominios efectores, permitiendo entonces obtener una proteína programable con actividad específica, que puede ser dirigida a un sitio preciso en el genoma (Mali y col., 2013b; Gilbert y col., 2013; Perez-Pinera y col., 2013 y Maeder y col., 2013). Entre las versiones actualmente disponibles de proteínas basadas en CRISPR/Cas9 se cuenta con enzimas metiladoras de ADN, acetiladoras o desacetiladoras de histonas, activadoras o represoras de la transcripción génica, entre otros (Gilbert y col., 2013; Perez-Pinera y col., 2013).

La fusión de la dCas9 con dominios de activación o represión de la transcripción permitió modular los niveles de expresión de genes endógenos de forma precisa y simple. Si bien los primeros moduladores programables de la activación fueron realizados sobre la base de las proteínas TALEN y ZFN (Beerli y col., 1998; Beerli y col., 2000; Zhang y col., 2011; Miller y col., 2011), las limitantes propias de estas tecnologías entorpecieron su aplicación. Las primeras versiones de la dCas9 "activadora de la transcripción", sistema llamado CRISPR-on, consistieron en la fusión de dCas9 con un dominio activador del herpes virus VP16 (dCas9-VP16) o 4 dominios repetidos y en tándem (dCas9-VP64). Estos sistemas daban lugar a un aumento moderado en la expresión génica, sin embargo al emplear múltiples guías no solapados y dirigidos al mismo promotor, se detectaba un efecto sinérgico que derivaba en una inducción más robusta de la expresión génica (Cheng y col., 2013; Hu y col., 2014; Maeder y col., 2013; Mali y col., 2013b; Perez-Pinera y col., 2013).

Rápidamente estos factores de transcripción artificiales fueron perfeccionados para lograr una inducción de la transcripción potenciada. Con la fusión de 10 o 12 dominios repetidos y en tándem de VP16, llamados dCas9-VP160 y dCas9-VP192, respectivamente, se redujo el número de guías necesarios para inducir la expresión génica (Chakraborty y col., 2014; revisado por Vora y col., 2016). Versiones más actualizadas, llamados "activadores de segunda generación" basaron su diseño en el uso combinado de distintos dominios de activación o del reclutamiento en trans de dichos dominios (Figura 1.10, revisado por Vora y col., 2016). Mediante la utilización de estos moduladores artificiales se logró una inducción de la expresión de hasta 300 veces respecto a la dCas9-VP64, empleando solo unos pocos sgRNA (Tanenbaum y col., 2014; Chavez y col., 2016; revisado por Vora y col., 2016). Todos los sistemas descriptos, con mayor o menor eficiencia, fueron empleados exitosamente para encender la expresión de genes individuales en células de diversas especies, incluso también se probó su utilidad para la activación de la transcripción de múltiples genes en simultáneo (Konermann y col., 2015; Gilbert y col., 2013; Maeder y col., 2013; Perez-Pinera y col., 2013; Cheng y col., 2013). Sin embargo, el riesgo de estos sistemas en referencia a la inducción de la expresión de genes de manera no específica, también se ve incrementada (Chavez y col., 2016).



**Figura 1.10. Esquema de sistemas activadores de la transcripción basados en CRISPR.** Se representan los activadores programables de primera generación (línea punteada) y de segunda generación, que combinan el uso de diferentes dominios de activación para inducir la expresión de genes. Figura adaptada de Chavez y colaboradores (2016).

A la fecha, y bajo nuestro conocimiento, no ha sido reportado el uso de estos sistemas para modulador la expresión de genes endógenos en embriones preimplantatorios de mamíferos. En drosófila la cruza de 1 adulto transgénicos con expresión constitutiva dCas9-VPR (figura 1.10) y otro con expresión constitutiva de 2 sgRNAs diseñados para reconocer el promotor del gen *Wingles*, que altera la morfología de las alas, dio lugar a larvas con fenotipo dominante asociado a la sobreexpresión de *Wingles* (Lin y col., 2015).

En ratón, Cheng y colaboradores (2013) microinyectaron cigotos murinos con ADN codificante para dCas9-VP64, 7 sgRNAs y un plásmido reportero con GFP y confirmaron la presencia de la proteína verde fluorescente en mórulas y blastocistos.

La posibilidad de modular la expresión de genes endógenos durante los estadios iniciales del desarrollo resulta sumamente interesante ya que permitiría, por un lado, profundizar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos y genes que gobiernan la formación y diferenciación del trofoblasto en mamíferos y, por otro lado, modular la diferenciación al linaje del trofoectodermo (TE) en embriones preimplantatorios, con el objetivo de corregir las posibles aberraciones que resultan de la producción *in vitro* de embriones.

### 1.6. Presentación del problema

La clonación por transferencia nuclear de célula somática (SCNT) es una técnica extremadamente valiosa que tiene como finalidad generar copias idénticas de animales genéticamente valiosos. Además, permite la producción de animales transgénicos con genotipos novedosos para la industria pecuaria, farmacéutica o la biomedicina. No menos importante es su utilidad a fines básicos, dado que permite estudiar, entre otras cosas, mecanismos claves de reprogramación y pluripotencia. Sin embargo, el proceso de clonación continúa siendo altamente ineficiente. Se observa una alta proporción de abortos y anomalías fetales debidas en gran medida a una ineficiente reprogramación de la célula donante, que deriva en patrones de expresión aberrante afectando principalmente la diferenciación celular y la placentación.

En este sentido, diferentes estrategias han sido desarrolladas para facilitar la reprogramación celular y/o mitigar las fallas observadas, pero aun así la producción de clones viables no supera el 15%. El advenimiento de nuevas tecnologías tanto para la producción y cultivo de embriones de SCNT como para el análisis de genoma, transcriptoma o proteoma, así como para la modificación puntual del ADN o de la regulación de la expresión génica, abre nuevas posibilidades para desarrollar estrategias que permitan perfeccionar la técnica y así incrementar la eficiencia de la clonación bovina por SCNT.

### 1.7. Objetivos

### 1.7.1. Objetivo General

Evaluar el uso de estrategias novedosas en vista de mejorar la eficiencia de la clonación en bovinos. Por un lado, desarrollar la agregación embrionaria en combinación con el uso de células con bajo grado de diferenciación como donante de núcleo para la producción de clones bovinos. Por otro lado, diseñar estrategias para la modulación de la expresión génica de embriones preimplantatorios, que puedan ser luego trasladadas a la producción de embriones por SCNT

### **1.7.2.** Objetivos Específicos

- ✓ Establecer un protocolo sencillo para el aislamiento de células madre de organismos adultos, a partir de muestras de tejido adiposo.
- Estudiar el efecto de la utilización de células donantes con distinto grado de diferenciación en la producción de embriones SCNT en combinación con la estrategia de agregación embrionaria.
- ✓ Aprender, aplicar y evaluar el uso del sistema CRISPR/dCas9-VP160 para modular la expresión de genes endógenos en embriones murinos y bovinos preimplantatorios, en vista de inducir la diferenciación al linaje del TE.

# 1.8. Hipótesis de trabajo

"El uso de células donantes multipotentes en conjunto con la agregación embrionaria permite mejorar las tasas de producción de clones bovinos".

"El sistema CRISPR/dCas9-VP160 permite modular la expresión endógena de genes claves para el desarrollo embrionario preimplantatorio, que sería de utilidad para dirigir la primera diferenciación y mejorar las tecnologías de producción *in vitro* de embriones, principalmente la clonación por SCNT".

Capítulo 2: Aislamiento y caracterización de células mesenquimales bovinas de tejido adiposo

### 2.1 Introducción

Las células madre mesenquimales (MSC), son células madre pluripotentes, nohematopoyéticas que derivan del mesodermo embrionario. Estas células poseen capacidad para autorenovarse indefinidamente y diferenciarse completamente, *in vivo* e *in vitro*, hacia aquellos tipos celulares de origen mesodérmico tales como osteocito, condrocito y adipocito (Liechty y col., 2000; Uccelli y col., 2008). Originalmente fueron aisladas de médula ósea, pero actualmente se sabe que también pueden ser aisladas de distintos tejidos, embrionarios y adultos, tales como placenta, líquido amniótico, cordón umbilical, fluido sinovial, tejido adiposo, hígado y músculo (Friedenstein, 1961; Campagnoli y col., 2001; Revisado por Barba y col., 2013).

Si bien las MSC derivadas de médula ósea (BMSC, del inglés bone marrow stem cell) son las mejor caracterizadas, en los últimos años se han reportado numerosas ventajas del uso de tejido adiposo respecto de otras fuentes para derivar células madre adultas. Por un lado, la obtención de grasa subcutánea implica un procedimiento simple y de invasión mínima comparado con el aislamiento de medula ósea o fluido sinovial (Kern y col., 2006) y, además, es posible realizar aislamientos repetitivos, sin dificultad ni complicaciones, en el mismo individuo. A diferencia de la placenta o del cordón umbilical, que son órganos transitorios, el tejido adiposo constituye una fuente permanente de células madre y permite derivarlas a partir de organismos adultos que expresen caracteres deseados. Por otro lado, se ha determinado en diferentes especies que una muestra de grasa posee hasta 100 veces más cantidad de células madre que una muestra equivalente de médula ósea (Bearden y col., 2017; Zuk y col., 2001; Webster y col., 2012; Al-Saqi y col., 2014). Respecto a las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC, del inglés "Adipose Stem Cells"), se ha demostrado que poseen mayor capacidad de proliferación y de diferenciación in vitro respecto de las BMSC y que, a diferencia de éstas, no muestran diferencias en el potencial de diferenciación con el aumento en la edad del donante. (Mitchell y col., 2006; Wagner y col., 2005; Kern y col., 2006; Zuk y col., 2002). Estos antecedentes permiten proponer al tejido adiposo como una fuente ideal y de alto rendimiento para el aislamiento de células madre de organismos adultos.

Debido a las características favorables de las ASC y su fácil extracción, el interés en el uso de éstas células en medicina regenerativa o biotecnologías de avanzada ha crecido

exponencialmente. Se ha reportado el aislamiento y caracterización de cultivos de ASC de muchas especies domésticas, entre ellas equino, cerdo y bovino (Vidal y col., 2007; Williams y col., 2008; Picou y col., 2009, Webster y col., 2012), sin embargo los protocolos empleados varían ampliamente en cuanto a la estrategia ya sea mediante cultivo de explantes o digestión enzimática, tiempos de tratamientos y sitios de extracción de la muestra (Reshak y col., 2013; da Silva y col., 2016; Williams y col., 2008; Ren y col., 2012; Oh y col., 2011; Vidal y col., 2007). Esto podría considerarse, por un lado, ventajoso, al poder aislar ASC a partir de protocolos con mayor o menor grado de dificultad pero, por otro lado, la falta de estandarización en el aislamiento y cultivo lleva a la necesidad de evaluar diferentes estrategias y, luego, realizar la caracterización de las células para confirmar su identidad, que se traducen en grandes demoras y altos costos para su utilización de forma rutinaria en el ámbito terapéutico o comercial.

Por tal motivo, el objetivo general de las experiencias descriptas en este capítulo fue determinar la mejor condición de aislamiento de células mesenquimales bovinas de tejido adiposo y caracterizar los cultivos derivados, priorizando el uso de procedimientos y protocolos sencillos y económicos que puedan ser replicados en laboratorios no sofisticados o, incluso, a campo.

Se ha reportado que las ASC promueven la angiogénesis y median la respuesta inmunológica cuando se las emplea en la regeneración de tejidos lesionados, como resultado de la secreción de citoquinas, factores de trascripción en incluso pequeños ARNs no codificantes que, en conjunto, crean un microambiente regulador entorno a ellas (Baglio y col., 2012; Katsuda y col., 2013; Kapur y col., 2013; Gao y col., 2016). Decidimos entonces evaluar el efecto del co-cultivo de ASC con embriones partenogenéticos en íntimo contacto, dentro de micropozos, tanto sobre el desarrollo embrionario como sobre las mismas ASC, estudiando si éstas tienen la plasticidad suficiente como para integrarse al embrión en desarrollo, como una estrategia nueva para la caracterización y utilización de las ASC.

El fin último de los experimentos realizados en este capítulo fue obtener células madre de individuos adultos que puedan ser utilizadas para mejorar la eficiencia de la clonación por SCNT.

### 2.2 Materiales y metodología

### 2.2.1 Diseño experimental

La realización de este capítulo comprendió, por un lado, la optimización de un protocolo de aislamiento de células mesenquimales de tejido adiposo y la posterior evaluación del carácter mesenquimal de las células aisladas. Por otro lado, se diseñó un ensayo para evaluar la plasticidad de las células, a través de su capacidad de incorporarse a embriones producidos *in vitro*.

Inicialmente, se colectó grasa subcutánea de animales enviados a faena y se compararon distintas estrategias de digestión enzimática. Las células aisladas fueron caracterizadas por citometría de flujo, empleando anticuerpos CD166 y CD44, característicos de células mesenquimales o CD45, específico de células hematopoyéticas.

Una vez determinada la mejor condición para el aislamiento de células mesenquimales de tejido adiposo, se colectó muestra de piel y de grasa subcutánea de una vaca Angus en pie, de alto valor genético. Los fibroblastos y células derivadas del tejido adiposo se cultivaron y conservaron congeladas en DMEM con DMSO, en nitrógeno líquido. Las células derivadas de tejido adiposo fueron caracterizadas mediante dos estrategias complementarias. Por un lado, se realizó análisis por citometría de flujo para detectar la presencia de antígenos de superficie específicos de células mesenquimales (CD166, CD44) y la ausencia de antígenos específicos de células hematopoyéticas (CD45). Por otro lado se realizó la inducción de la diferenciación de las células hacia condrocito, osteocito y adipocito, para evaluar el potencial multipotente de las células aisladas.

Finalmente, se evaluó la plasticidad de las ASC estudiando la capacidad de estas células para formar parte de un embrión en desarrollo, siguiendo el esquema representado en la Figura 2.1. Brevemente, luego de la activación partenogenética, embriones libres de ZP fueron ubicados de forma individual en micropozos. Al día 5 del cultivo *in vitro*, se llevó a cabo la agregación embrionaria (dos mórulas libres de ZP fueron ubicados juntas en un micropozo, grupo PA2X) y la complementación de los embriones con 30 a 70 células somáticas, ya sean ASC (grupo PA2X+ASC) o fibroblastos fetales bovinos (grupo PA2X+FFB). Para poder determinar de forma sencilla la ubicación y potencial integración de las células a los embriones, las ASC fueron previamente teñidas con el

colorante catiónico lipofílico CM-DIL (coloración roja), mientras que los FFB empleados procedieron de un animal transgénico con expresión constitutiva de la proteína fluorescente venus (color verde bajo luz azul). Se incluyó además un grupo con ZP al que se le microinyectaron 20 células ASC en el espacio perivitelino (grupo PA ZP + ASC) a día 5 del cultivo *in vitro*. Se evaluó la presencia o ausencia de células somáticas en los blastocistos producidos detectando células verdes o rojas bajo exposición a luz UV, en un microscopio de fluorescencia.

Los resultados presentados en ese capítulo permitieron establecer un protocolo eficiente y sobre todo sencillo para el aislamiento de ASC de animales adultos y, además, evidenciar la mutua influencia que ejercen células somáticas y embriones partenogénicos, cuando se los co-cultiva en íntimo contacto dentro de micropozos, aún cuando no existe integración.



**Figura 2.1. Esquema de evaluación de la capacidad de ASC y FFB para formar parte de un embrión en desarrollo.** Embriones partenogenéticos libres de zona pelúcida (ZP) fueron cultivados de forma individual hasta día 5 del cultivo *in vitro*. Luego, 2 mórulas fueron ubicadas juntas en un único micropozo (PA2X) y algunos de ellos fueron, además, complementados con células ASC marcadas con *Mitotracker* rojo (PA2X + ASC) o FFB (PA2X+FFB), con expresión de la proteína fluorescente verde Venus. Se incluyó un grupo con ZP inyectado a día 5 con ASC en el espacio perivitelino (PA ZP+ASC). Se evaluó la integración de las células en blastocistos a día 7, por detección de la fluorescencia con UV.

# 2.2.2 Punción folicular y colección de complejos oocito-cúmulus (COCs)

Ovarios provenientes de vacas adultas enviadas a faena fueron transportados al laboratorio dentro de las 3 hs de ser colectados. En el laboratorio, los complejos cúmulusoocito (COCs) fueron recuperados por aspiración mecánica de los folículos con un diámetro de 3 a 8 mm. Para esto se emplearon agujas calibre 18G acopladas a jeringas de 10 cc con medio Tyrodes albumina lactato piruvato con hepes (TALP-H, Bavister y Yanagimachi, 1977) precalentado a 37°C. Los folículos con tamaño menor a 3 mm fueron excluidos dado el bajo potencial de desarrollo de los COCs (Lonergan y col., 1994), mientras que aquellos con tamaño mayor a 8 mm no fueron punzados ya que contienen una concentración de fibrinógeno suficiente como para coagular el fluido folicular y complicar la posterior recuperación de los COCs. El fluido recuperado en las jeringas durante la punción folicular fue descargado en tubos cónicos de 50 ml que se mantuvieron en posición vertical para permitir la decantación de los COCs. El pellet formado fue colocado en placas de Petri de 100 mm conteniendo TALP-H y aquellos oocitos con citoplasma homogéneo y rodeados completamente por 2 o 3 capas de células de cúmulus compacto fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica, lavados en TALP-H y colocados en gotas para estimular su maduración.

# 2.2.3 Maduración in vitro (MIV)

Para la maduración de los COCs seleccionados se empleó TCM-199 con sales de Earle (11150042; Gibco, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios, BsAs, Argentina), 1% de Antibiótico-Antimicótico (ATB/ATM, penicilina 10000 UI/ml, estreptomicina 10 mg/ml y anfotericina B 25  $\mu$ g/ml; código15240-096; Gibco, NY, USA), 0.3 mM de piruvato de sodio (P2256), 100  $\mu$ M de cisteamina (M9768) y 2  $\mu$ g/ml de Hormona Folículo Estimulante (FSH, NIH-FSH-P1, Folltropin®, Bioniche, Australia), que llamaremos "medio de maduración". Al menos 2 hs previo a la MIV se prepararon placas de 65 mm con gotas de 100  $\mu$ I de medio de maduración cubiertas por aceite mineral (M8410), las cuales fueron colocadas en incubadora (3111; Thermo Electron Corporation, USA) con atmósfera de 6% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad a 38.5°C, para permitir la calibración del pH. Grupos de 20 a 25 COCs fueron colocados juntos en cada gota de medio e incubados durante 21 a 24 hs en incubadora.

# 2.2.4 Denudado de COCs y remoción de la zona pelúcida

Las células del cúmulus fueron removidas por agitación mecánica. Para esto, los COCs fueron ubicados en tubos cónicos de 1.5 ml conteniendo 1 mg/mL de hialuronidasa (H-4272) preparada en medio TALP-H y sometidos a agitación por vortex durante 3 min. Luego se agregó 1 ml de TALP-H precalentado para diluir la enzima y todo el contenido fue colocado en una placa de cultivo de 35 mm conteniendo 2 ml de TALP-H. Los oocitos fueron recuperados bajo lupa estereoscópica y lavados 2 veces en TALP-H. La maduración nuclear se evaluó mediante la detección del primer corpúsculo polar (1CP) en los oocitos denudados, bajo lupa estereoscópica (Figura 2.2). Sólo se emplearon oocitos maduros para los experimentos de activación partenogenética. Para remover la ZP, los oocitos maduros fueron tratados con 1.5 mg/ml de pronasa (P-8811) en TALP-H hasta digestión total de la ZP y luego lavados sucesivamente en gotas de TALP-H suplementado con 10% SFB para inactivar la enzima. Finalmente, los oocitos maduros y libres de ZP fueron colocados en la incubadora, en microgotas calibradas de 100 µl de SOF suplementado con aminácidos y 2,5% SFB (SOFaa, Holm y col., 1999) hasta su utilización.



**Figura 2.2. Maduración** *in vitro* **de oocitos bovinos.** (A) COCs colectados de ovarios de matadero (20X). (B) COCs luego de la maduración *in vitro*, con cúmulus expandido (20X). (C) Oocitos denudados y maduros, la flecha indica el primer corpúsculo polar que confirma la maduración nuclear (100X).

# 2.2.5 Aislamiento de ASC a partir de:

## 2.2.5.1 Bovinos post-mortem

Se colectaron muestras de grasa de 4 animales inmediatamente post-faena, en el frigorífico IFSSA (Industrias Frigoríficas Sur S.A. SENASA N° 3574, Loma Hermosa,

Buenos Aires, Argentina). Aproximadamente 1 gr de grasa fue aislada de la región inguinal de cada res en la línea de faena y colocada en un tubo cónico de 15 ml conteniendo 10 ml de DPBS suplementado con 4% ATB/ATM. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología Animal, FAUBA, a temperatura ambiente.

# 2.2.5.2 Bovino adulto en pie

Las muestras de grasa fueron colectadas de forma aséptica y empleando anestesia local, por una médica veterinaria en la Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro Atómico Ezeiza. El área alrededor de la grupa de una vaca de raza Angus fue rasurada y lavada al menos 2 veces con jabón neutro. Luego del lavado, se realizó la desinfección de la zona con Iodo-povidona y finalmente con alcohol etílico al 70%, preparado en agua destilada. La toma de la muestra se realizó con sacabocado estéril para biopsias, separando inicialmente el disco de epidermis/dermis para visualizar la grasa subcutánea fueron colocados en un tubo cónico conteniendo DPBS suplementado con 4% ATB/ATM para ser transportada al laboratorio. Se realizó una sutura simple en la herida y se aplicó Cipermetrina (curabichera) de forma preventiva.

Una vez en el laboratorio, el tejido graso colectado, ya sea de res o del animal en pie, fue lavado al menos 3 veces en DPBS suplementado con 4% ATB/ATM y disgregado con bisturí estéril, dentro de la cabina de flujo laminar. Luego, la muestra fue colocada en un tubo cónico de 50 ml conteniendo 25 ml de solución de Colagenasa tipo I (Worthington, 4197) en DPBS (Sigma, 85040C). Para las muestras de grasa recuperadas de res, se evaluaron 4 condiciones distintas de tratamientos con Colagenasa tipo I: A) 0.05% P/V; B) 0.25% P/V C) 0.25% P/V con 0.25% BSA y D) 0.60 % P/V. Aquel tratamiento que permitió obtener la mayor cantidad de células (Tratamiento C) fue seleccionado para tratar la muestra de grasa subcutánea del bovino de alto valor genético, incluyendo además otra estrategia derivada de ésta, que consistió en colagenasa tipo I: 0.6% P/V con 0.25% BSA. En todos los casos, la muestra se incubó con el tratamiento enzimático durante 2 hs a 37°C en agitación. Luego de la incubación se agregaron 15 ml de DPBS y se agitó cada tubo vigorosamente por 1 a 2 min. A continuación la muestra fue centrifugada a 1.600 RPM por 5 min, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue resuspendido en DMEM suplementado con 5% SFB y 1% ATB/ATM. Este último paso se realizó por duplicado para lavar las células. Finalmente las células fueron resuspendidas en DMEM suplementado con 5% SFB y 1% ATB/ATM y colocadas en placas de cultivo de 65 mm de diámetro, en incubadora bajo 6% CO<sub>2</sub> en aire humidificado a 38.5 °C.

# 2.2.6 Caracterización de células de tejido adiposo por citometría de flujo

La inmunotipificación de las células derivadas de tejido adiposo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Regeneración Cardiovascular, del Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMETTYB), Universidad Favaloro. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo para detectar la presencia de antígenos específicos de linaje (CD166, CD44 y CD45) en la superficie de las células bovinas aisladas de tejido adiposo. Las células fueron resuspendidas en DPBS suplementado con 4% BSA (concentración aproximada de 5.10<sup>5</sup> células/ml) e incubadas en oscuridad durante 30 min con el anticuerpo adecuado: anticuerpo murino anti-CD166 humano, conjugado con PE (BD Biosciences), anticuerpo murino anti-CD44 ovino, conjugado con FITC (AbD Serotec, Oxford, UK). Luego, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 800 rpm y el pellet obtenido fue resuspendido en DPBS. Para cada muestra se evaluaron al menos 10.000 eventos y el análisis de los datos recopilados se realizó con el software Cyflogic 1.2.1 (Laboratorio de Regeneración Cardiovascular, IMETTyB, Universidad Favaloro).

# 2.2.7 Caracterización de células de tejido adiposo por diferenciación in vitro

Se evaluó el potencial de diferenciación *in vitro* de las células aisladas a condrocito, adipocito y osteocito, empleando los kits StemPro Chondrogenesis (A10071-01, Gibco), StemPro Adipogenesis (A10070-01, Gibco) y StemPro Osteogenesis (A10072-01, Gibco) respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor para la inducción de la diferenciación. Luego de 14 días de inducción, las células fueron fijadas con solución de paraformaldehído al 4% por 45 min a temperatura ambiente y sometidas a tinción. Para evaluar la diferenciación a adipocitos, las células fueron teñidas con solución saturada de Sudan rojo en etanol 70% y lavadas exhaustivamente con etanol 70%. La evaluación de la inducción osteogénica fue realizada por tinción con carmín de alizarina al 2% por 3 min y enjuague con agua destilada. La inducción a condrocito se evaluó por tinción con azul alcián al 1% durante 30 min y enjuague con agua destilada.

Todos los preparados fueron evaluados en microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-S y las imágenes analizadas por el software Eclipse Net software, en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, FLENI, Escobar, Argentina.

# 2.2.8 Aislamiento de fibroblastos adultos bovinos (FAB)

Los fibroblastos adultos fueron obtenidos por cultivo *in vitro* de biopsias de piel. El disco de epidermis/dermis aislado en conjunto con la muestra de grasa subcutánea fue transportado al laboratorio en DPBS suplementado con 4% ATB/ATM a fin de ser procesado. El tejido colectado fue lavado al menos 3 veces en DPBS suplementado con 4% ATB/ATM y disgregado con bisturí estéril, dentro de la cabina de flujo laminar, hasta obtener biopsias de 1 mm<sup>2</sup>, aproximadamente. Entre 5 y 6 biopsias fueron colocadas en placas de cultivo de 35 mm y cubiertas con DMEM suplementado con 5% SFB y 2% ATB/ATM. La incubación se realizó en incubadora, bajo 6% CO<sub>2</sub> en aire humidificado a 38.5 °C, hasta la formación de una monocapa de fibroblastos en torno a las biopsia. Luego, las biopsias fueron retiradas y las células cultivadas como se detalla a continuación.

# 2.2.9 Cultivo de células somáticas

Las células somáticas, sean ASC o fibroblastos, fueron cultivadas en medio DMEM (11885, Gibco) suplementado con 5% SFB y 1% de ATB/ATM, con renovación del 50% del medio de cultivo cada 48 hs. Las condiciones de cultivo fueron 6% CO<sub>2</sub> en aire humidificado a 38.5 °C. Luego de establecer el cultivo primario, las células fueron replaqueadas previo a alcanzar la confluencia. Para esto, se removieron las células muertas lavando el cultivo con 1 ml de DPBS suplementado con ATB/ATM. Luego se realizó la digestión enzimática agregando 1 volumen de 0.05% Tripsina-EDTA (25300, Gibco) por un tiempo máximo de 5 min, a 38.5 °C, seguido de la inactivación de la enzima con 2 volúmenes de DMEM (11885, Gibco) suplementado con 10% SFB y 1% de ATB/ATM. Las suspensión celular se colocó en un tubo plástico cónico de 15 ml y se centrifugó por 5 min a 1200 RPM. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en DMEM suplementado con 10% SFB y 1% de ATB/ATM y re-plaqueadas. Finalmente, los cultivos celulares con pasaje entre 2 y 4 fueron criopreservados en nitrógeno líquido.

### 2.2.10 Criopreservación de células somáticas

Los cultivos celulares fueron tratados con tripsina y las células fueron resuspendidas en medio DMEM con 20% SFB y 10% DMSO. 1 ml de suspensión celular fue colocado en un vial de 2 ml con tapa a rosca adecuadamente rotulado y éstos ubicados en el recipiente de congelación "Mr. Frosty" (Thermo Scientific, 5100). Se realizó un enfriamiento inicial a -80°C por 24 hs y luego los viales fueron colocados rápidamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento. Al menos 4 días previos al procedimiento de clonación, 1 vial de ASC y/o FAB fue descongelado en un baño de agua a 37 °C e inmediatamente después se agregó 1 ml de DMEM suplementado, para diluir el DMSO. La suspensión fue centrifugada a 1200 RPM durante 5 min y el pellet fue resuspendido en DMEM fresco. Las células fueron cultivadas tal y como se indicó previamente (sección 2.2.10).

# 2.2.11 Activación química de oocitos

Los oocitos maduros (con o sin ZP, según correspondiera) fueron activados químicamente mediante tratamiento inicial con ionomicina (I24222; Invitrogen, California, USA) 5  $\mu$ M preparada en 2 ml de TALP-H a 37°C, durante 4 min en oscuridad, seguido de 2 lavados sucesivos con 2 ml de TALP-H. Luego, los embriones fueron ubicados en gotas de 5 ul de SOFaa previamente calibrado contendiendo 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, D2629) 2 mM, cubiertas con aceite mineral e incubados durante 3 hs. Finalmente se realizaron 3 lavados sucesivos y exhaustivos con 2 ml de TALP-H, para remover la droga. Los embriones partenogenéticos fueron cultivados como se describe a continuación.

## 2.2.12 Cultivo de embriones

Para el cultivo de embriones libres de ZP se utilizó el sistema de micropozos o "*Well* of the Well" previamente descripto por Vajta y colaboradores (2000). Brevemente, los micropozos se produjeron empleando un capilar de vidrio calentado en su punta, el cual se apoyó y presionó en la base de una placa de Petri, de modo de generar depresiones de aproximadamente 500 µm de diámetro en ésta. Se realizaron 20 a 25 micropozos próximos entre sí, los que se cubrieron con 100 µl de medio de SOFaa y, finalmente, con aceite mineral. Inmediatamente luego de la activación, cada embrión libre de ZP fue ubicado de forma individual en un micropozo. Los embriones partenogenéticos con ZP

fueron cultivados en grupos de 20, en gotas de 100 ul de SOFaa cubiertas por aceite mineral. El 50% del medio de cultivo se renovó al día 2 post activación (p.a.), mientras que a día 5 p.a. se agregaron 10 ul de SFB. La formación de blastocistos se evaluó al día 7 p.a.

## 2.2.13 Complementación celular de embriones

A día 5 del cultivo *in vitro*, dos mórulas libres de ZP fueron ubicadas juntas en un mismo micropozo (grupo PA2X) y, a su vez, se ubicaron en el mismo micropozo entre 30 y 70 células somáticas (complementación celular), empleando una pipeta Pasteur de vidrio estirada en su punta, de modo de tener mayor precisión. Para la complementación celular se emplearon ASC (grupo PA2X+ASC) o fibroblastos fetales bovinos (grupo PA2X+FFB). Se incluyó además un grupo con ZP al que se le microinyectaron 20 células ASC en el espacio perivitelino (grupo PA ZP + ASC) a día 5 del cultivo *in vitro*.

Para poder determinar de forma sencilla la integración de las células a los embriones, los FFB empleados procedieron de un animal transgénico con expresión constitutiva de la proteína fluorescente venus (construcción pT2/SB-Venus, detectada como verde bajo luz UV, a 488 nm), mientras que las ASC fueron previamente teñidas con el colorante catiónico lipofílico CM-DIL que presenta fluorescencia roja bajo luz UV (570 nm). Con este fin, el cultivo de células ASC fue lavado con DPBS y luego tratado con solución 0.5 uM CellTrackerTM CM-DiI (C7000, Invitrogen) diluido en DMEM por 45 min, en incubadora bajo 6% CO<sub>2</sub> en aire humidificado a 38.5 °C. Luego se realizaron 2 lavados con DPBS y se resuspendieron las células por tratamiento con tripsina para su utilización.

La formación de blastocistos y la integración de las células somáticas se evaluaron al día 7 p.a., mediante exposición a luz UV.

## 2.2.14 Análisis estadístico

El ensayo de complementación celular contó con 3 repeticiones biológicas. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher, usando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p \le 0.05$ .

#### 2.3 Resultados

En el presente capítulo se determinó la mejor condición para el aislamiento de células mesenquimales bovinas de tejido adiposo y se llevó a cabo la caracterización de las mismas mediante la detección de antígenos de superficie por citometría de flujo. La mejor condición de aislamiento se empleó para derivar células mesenquimales de un bovino adulto de alto valor genético y el cultivo se caracterizó por citometría de flujo e inducción de la diferenciación a osteocito, condrocito, y adipocito. Finalmente, se ensayó la plasticidad de las células ASC a través de una novedosa estrategia de co-cultivo en micropozos, para evaluar la capacidad de éstas para integrarse a un embrión partenogenético y el efecto del co-cultivo tanto sobre las células como los embriones.

2.3.1 Aislamiento y caracterización de células mesenquimales bovinas derivadas de tejido adiposo (ASC) de animales post-mortem.

Se colectó aproximadamente 1gr de grasa de la región inguinal de 4 animales enviados a matadero, inmediatamente post-faena. Estas fueron transportadas al laboratorio y procesadas de manera independiente, evaluando 4 estrategias distintas de digestión enzimática:

- 1. Solución 0.05% P/V de Colagenasa tipo I en DPBS.
- 2. Solución 0.25% P/V de Colagenasa tipo I en DPBS.
- 3. Solución 0.25% P/V de Colagenasa tipo I en DPBS con 0.25% de BSA.
- 4. Solución 0.60% P/V de Colagenasa tipo I en PBS.

Todos los tratamientos fueron incubados y cultivados en condiciones equivalentes. A las 48 hs de establecido el cultivo, se evaluó la presencia de células adheridas a la base de cada placa. No se detectaron células en las placas derivadas de los tratamientos 1 y 2. En relación a los tratamientos 3 y 4, el primero resultó notablemente mejor que el segundo, ya que dio lugar a un cultivo con aproximadamente 30% de confluencia a las 48 hs; mientras que para el tratamiento 4 solo se observaron pocas células adheridas a la base y ubicadas de forma aislada.

El cultivo celular derivado del tratamiento con Colagenasa I y BSA (estrategia 3) fue caracterizado mediante la identificación de marcadores de superficie específicos para evaluar el estado de diferenciación en el que se encontraban las células. Los resultados
obtenidos de la citometría de flujo se resumen en la Figura 2.3. Cerca del 35 % de las células analizadas mostraron ser positivas para la presencia de CD44 y CD166, mientras que CD45 no fue detectada mediante tinción específica contra este antígeno en las células analizadas.

CD44 es un receptor de membrana para ácido hialurónico, involucrado principalmente en los procesos de adhesión, migración y proliferación de MSC (Lesley y col., 2000). La proteína CD166 también participa en los mecanismos de adhesión pero, a diferencia de CD44, ha sido descripta en la superficie tanto de células mesenquimales como células madre hematopoyéticas (Bianco y col., 2001). CD45, en cambio, se expresa de manera constitutiva en la superficie de células hematopoyéticas, por lo que se emplea como control negativo en la caracterización de MSC.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que un tercio de las células aisladas serían células mesenquimales de tejido adiposo. Resulta importante considerar que el tejido adiposo colectado no fue el ideal, lo que podría afectar negativamente el resultado.



0.4%



# 2.3.2 Aislamiento de fibroblastos y de células derivadas de tejido adiposo de bovino en pie

Una vez evaluadas las distintas estrategias de aislamiento de células, se colectó tejido adiposo subcutáneo de una vaca en pie de raza Angus, de alto valor genético. La muestra se dividió en partes iguales y se procesó siguiendo 2 condiciones distintas, considerando los resultados obtenidos previamente:

- 1. Solución 0.25% P/V de Colagenasa tipo I en DPBS con 0.25% de BSA.
- 2. Solución 0.60% P/V de Colagenasa tipo I en DPBS con 0.25% de BSA.

La digestión enzimática y cultivo se realizó siguiendo los pasos descriptos anteriormente. Ambos tratamientos permitieron aislar células de tejido adiposo y establecer cultivos celulares. Sin embargo, el tratamiento 2 fue más eficiente respecto a la cantidad de células aisladas, observándose aproximadamente un 30% confluencia para el primer tratamiento y aproximadamente un 50% de confluencia para el segundo, a las 48 hs de establecido el cultivo.

Con el objetivo de obtener células con igual genética pero distinto grado de diferenciación, se aislaron fibroblastos adultos bovinos (FAB) de la biopsia de piel obtenida al recuperar la muestra de grasa subcutánea de la vaca de raza Angus. Una vez establecidos los cultivos primarios, se comparó la morfología de las células derivadas de grasa y piel. El cultivo primario de FAB mostró una población celular uniforme y homogénea, con morfología fusiforme que se mantuvo en los sucesivos pasajes. En cambio, la morfología de las células bovinas derivadas de tejido adiposo fue notablemente heterogénea inicialmente, observándose la presencia de una población de células redondeadas así como otra de morfología fusiforme adheridas a la base placa (Figura 2.4 A, indicado con flechas). Sin embargo, luego de sucesivos pasajes (entre 2 y 3), el cultivo de ASC derivó en una población homogénea con morfología fibroblastoide.

Todos los cultivos celulares obtenidos fueron repicados al alcanzar el 80% de confluencia, hasta un máximo de 4 veces (pasaje 4) y finalmente criopreservados en nitrógeno líquido.



**Figura 2.4. Morfología del cultivo primario de ASC (A) y FAB (B).** El cultivo primario de ASC mostró células con morfología heterogénea, a diferencia del cultivo de FAB, con gran homogeneidad. Las flechas indican las 2 poblaciones con diferente morfología en el cultivo de ASC.

La caracterización de las células adiposas respecto al estado de diferenciación se llevó a cabo mediante dos estrategias complementarias; por un lado, la inmunotipificación por citometría de flujo, tal como se describió anteriormente, y por otro lado, la evaluación de la plasticidad de las células por inducción de la diferenciación *in vitro* hacia 3 linajes celulares distintos: condrocito, osteocitos y adipocito.

Del análisis por citometría de flujo, cuyos resultados se muestran en la figura 2.5, se desprende que cerca del 80% de las células analizadas mostraron ser positivas para la presencia de CD44 y CD166 en la superficie celular, marcadores específicos para el linaje mesenquimal. Además, resultaron negativos al evaluar la presencia de CD45, específico de células hematopoyéticas.





Figura 2.5. Inmunotipificación de células derivadas de tejido adiposo *in vivo* por citometría de flujo. Se evaluó la presencia de CD44 y CD166, específicos para células mesenquimales y la ausencia de CD45, específico para células hematopoyéticas. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia en el eje X y la distribución en el eje Y. El control se muestra en rojo.

Respecto a la multipotencialidad de las células aisladas, cultivos celulares de pasaje 4 o menos fueron tratados durante 14 días para inducir la diferenciación in vitro de las células a adipocitos, osteocitos y condrocitos, de forma química. Luego del tratamiento, los cultivos celulares fueron fijados y teñidos con colorantes específicos para evaluar la diferenciación. Durante la inducción de la diferenciación, las células en cultivo mostraron notables cambios morfológicos que pueden observarse en la Figura 2.6. Luego de la inducción adipogénica se detectó la acumulación de microgotas de lípidos de diversos tamaños en el citoplasma de las células tratadas (Figura 2.6, columna 1). Todas las microgotas resultaron colorearse selectivamente de rojo-anaranjado al emplear el colorante lipofílico Sudán rojo. Las células tratadas con medio condrogénico mostraron una coloración azul-verdosa luego de la fijación y tinción con azul alcián. Este colorante presenta gran afinidad por los glicosaminoglicanos, los cuales son abundantes en la matriz extracelular cartilaginosa y rodean a los condrocitos cultivados in vitro (Figura 2.6, columna 2). Finalmente, luego de la inducción osteogénica, las células formaron grandes aglomerados que mostraron una coloración rojo intensa luego del tratamiento con carmín de alizarina, lo que confirma la presencia de depósitos de calcio en las células tratadas (Figura 2.6, columna 3).



**Figura 2.6. Evaluación de la multipotencialidad de las células derivadas de tejido adiposo.** Se evaluó y confirmó el potencial adipogénico (Columna 1), condrogénico (Columna 2) y osteogénico (Columna 3).

2.3.3 Evaluación de la capacidad de ASC y FFB para formar parte de un embrión en desarrollo.

Como prueba de concepto para la caracterización de las ASC, estudiamos la plasticidad de las células a través de una novedosa estrategia de co-cultivo en micropozos. En este sentido, evaluamos la capacidad de un número discreto de células somáticas con bajo grado de diferenciación (como son las ASC) para integrarse y formar parte de un embrión libre de ZP al agregarlos entre sí o por inyección de las células en un embrión con ZP. Con este fin, en el día 5 del cultivo se realizó la agregación de embriones partenogenéticos libres de ZP (PA2X) a los que se complementó con células somáticas utilizando ya sea ASC (PA2X+ASC) o fibroblastos fetales bovinos como control (PA2X + FFB). Se incluyó además un grupo con ZP microinyectado con células ASC (grupo ZP + ASC), en el cual se aseguró el contacto entre las células y las blastómeras. Para poder distinguir células somáticas complementadas respecto de las blastómeras del embrión, las ASC utilizadas fueron teñidas previamente con el colorante catiónico lipofílico CM-DIL (coloración roja bajo luz UV, Figura 2.7), mientras que los FFB empleados procedieron de un animal transgénico con expresión constitutiva de la proteína fluorescente Venus (color verde bajo luz azul, 488 nm).



**Figura 2.7. Cultivo y tinción de células ASC.** Células ASC en monocapa tratadas con el colorante CM-DIL y cultivadas por 3 días en DMEM. Se observan las células en campo claro (A) y la fluorescencia roja bajo exposición UV (B).

El cuadro 1 muestra los datos experimentales obtenidos. Se observa que las tasas de blastocistos se incrementaron al complementar embriones con células FFB (PA2X + FFB); sin embargo, éstas no se incorporaron al embrión, como tampoco lo hicieron las ASC (Figura 2.7). Curiosamente, se observó que en algunos casos los FFB, al ser cultivados en presencia de embriones, formaron agregados bien definidos entre sí que no

fueron vistos cuando las células se cultivaron en iguales condiciones pero en ausencia de embriones (Figura 2.8). El análisis de los cúmulos empleando tinción con DAPI y exposición a UV confirmó que se trata de un grupo de células asociadas entre sí (Figura 2.8, B), mientras que la detección de color verde confirma que se tratan de FFB (Figura 2.8, C) y no así de blastómeras embrionarias, excepto en un caso en el que se detectan blastómeras rodeadas por FFB (Figura 2.8, flecha). Cada grupo de células fue encontrado en un pozo individual y este resultado no se observó al emplear células ASC.

La inyección de ASC en embriones partenogenéticos (ZP +ASC) tampoco favoreció la integración de las células ASC, a pesar de estar en íntimo contacto dentro de la ZP.

	Grupo	n (D5)	Mórula (%)	Blastocistos (%)
PA ZF	PA2X	21	8 (38,1)	8 (38,1) <sup>a</sup>
	PA2X+ASC	55	27 (49,1)	27 (49,1) <sup>ab</sup>
	PA2X+FFB	66	42 (63,6)	42 (63,6) <sup>b</sup>
PA ZP	ZP+ASC	32	22 (68,8)	22 (68,8) <sup>b</sup>

Cuadro 2.1. Efecto de la complementación celular en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos partenogenéticos

(a,b) Distintos superíndices en la misma columna indican diferencia significativa (Test de Fisher, p<0.05). PA, embrión partenogenético; ZF, libre de zona pelúcida; ZP, con zona pelúcida

Pese a que la estrategia de co-cultivo de células y embriones en micropozos no resultó de utilidad para evaluar la plasticidad de las ASC, el resultado más llamativo que se desprende de los datos es el potencial de esta estrategia para inducir alteraciones en las células somáticas, de una forma sencilla y económica, sin suplementos en el medio de cultivo.



**Figura 2.8. Embriones partenogenéticos al día 7 p.a.** A y D) Embriones libres de ZP agregados con células ASC previamente teñidas con el colorante CM-Dil. B y E) Embriones libres de ZP agregados con FFB que llevan la construcción pT2/SB-Venus C y F) Embriones con ZP Inyectados con ASC previamente marcadas con CM-DIL.



## 2.4 Discusión

Los resultados descriptos en este capítulo permitieron establecer un protocolo eficiente para aislar células mesenquimales bovinas de tejido adiposo de un animal adulto en pie. Dado que han sido reportados múltiples protocolos que varían ampliamente no solo en la estrategia empleada para el aislamiento de ASCs (explantes, digestión enzimática, tiempos de incubación) sino en las técnicas de cultivo empleado (suplementación del medio de cultivo, co-cultivo en monocapa) (da Silva y col., 2016; Picou y col., 2009; revisado por Reshak y col., 2013), decidimos establecer nuestra propia estrategia priorizando por sobre todo la sencillez del protocolo. Una vez establecidos los cultivos primarios, confirmamos el origen mesenquimal y la multipotencialidad de las células aisladas empleando estrategias complementarias. Debido a su carácter multipotencial, estas células resultan atractivas para su utilización en procedimientos de SCNT ya que fue demostrado que el uso de células con menor grado de diferenciación como donantes de núcleo dan lugar a un incremento en la producción de blastocistos (Revisado por Ogura y col., 2013).

La extracción de grasa subcutánea pudo realizarse con el vacuno en pie, mediante un procedimiento rápido, sencillo y de invasión mínima, en el que solo se utilizó anestesia local e instrumental quirúrgico básico. Esto representa una ventaja respecto de la obtención de muestras de otros tejidos adultos, como por ejemplo medula ósea o hígado, que requieren sedación e implican maniobras invasivas, uso de equipamiento sofisticado y tratamientos post-quirúrgicos prolongados para evitar complicaciones por infección (Kern y col., 2006).

En esta tesis se evaluaron, en total, 5 condiciones diferentes de digestión enzimática para el aislamiento de ASC en las que se varió la concentración de Colagenasa tipo I (0.05%, 0.25% y 0.6% P/V) y se evaluó el uso de 0.25% P/V de BSA para la digestión con 0.25% y 0.6 % P/V de Colagenasa, fijando en todos los casos el tiempo de incubación en 2 hs. La baja concentración de Colagenasa en ausencia de BSA no fue efectiva para derivar células de tejido adiposo mientras que el tratamiento más agresivo resultó ser el más eficiente para la recuperación de ASC. En un trabajo contemporáneo a esta tesis, los autores llegaron a las mismas conclusiones al comparar 3 concentraciones de Colagenasa tipo I (0.075%, 0.3% y 0.6% P/V) para obtener ASC, sin embargo en este trabajo no fue realizada la caracterización de las células obtenidas por lo que estos resultados no arrojan

luz respecto de utilidad del protocolo para aislar células madre mesenquimales (Reshak y col., 2013). Es así que nuestros resultados complementan las publicaciones previas al confirmar, mediante la caracterización de los cultivos obtenidos, que las células aisladas son efectivamente mesenquimales.

Los cultivos primarios derivados del tratamiento enzimático mostraron ser inicialmente heterogéneos en cuanto a la morfología celular. Sin embargo, luego de sucesivos pasajes, el cultivo de ASC derivó en una población homogénea con morfología fibroblastoide. Estos resultados coinciden, en general, con los reportados en estudios anteriores, realizados tanto en bovinos como porcinos (Picou y col., 2009; Bosch y col., 2006) e incluso uno de los primeros reportes de aislamiento de BMSC también describe este mismo comportamiento de los cultivos primarios (Friedenstein y col., 1974). Es posible que el cultivo inicial contenga, además de ASC, otros tipos celulares presentes en el tejido adiposo y que estas poblaciones celulares dejen de proliferar luego de un cierto número de divisiones, al entrar en senescencia. El hecho de que las ASC presentan una alta tasa de proliferación, capacidad para dividirse por un mayor número de pasajes que otros tipos celulares y muestran marcada adherencia al plástico, permite enriquecer la población mediante lavado de los cultivos y repique de los mismos de forma sucesiva, lo explicaría la homogenización observada en referencia a la morfología.

Las células aisladas de tejido adiposo subcutáneo resultaron positivas al evaluar la presencia de CD44 y CD166 en la superficie celular, mientras que no mostraron marca para CD45. Esta inmunotipificación de las células se realizó empleando anticuerpos específicos para CD44 y CD45 ovino y CD166 humano, dada la escasez de anticuerpos comercialmente disponibles para antígenos bovinos. La reactividad cruzada para detectar CD166 en ovino fue probada en un trabajo previo (Locatelli y col., 2015) y además se ha reportado una conservación de secuencia del 93% entre CD166 bovino y humano, por lo que confiamos en la utilidad de este anticuerpo para su empleo en células bovinas (Rogers y col., 2002). Si bien los ensayos de inmunotipificación han sido establecidos por la ISCT como un criterio para sospechar el carácter mesenquimal de las células, por sí solo no resulta suficiente para la identificación. Es así que decidimos profundizar en la caracterización de las células aisladas, evaluando su capacidad de diferenciación *in vitro*, tal como recomienda la ISCT pero además explorando métodos alternativos.

Respecto a la caracterización de la multipotencialidad de las células, la detección de gotas lipídicas luego de la inducción adipogénica, además de la presencia de glicosaminoglicanos en los cultivos tratados con inductores de la diferenciación a condrocito y, finalmente, la detección de precipitados de calcio en el cultivo celular luego de la inducción osteogénica confirman la plasticidad de las células aisladas del tejido adiposo.

Finalmente, como una nueva estrategia para evaluar la plasticidad de las células derivadas de grasa, estudiamos la capacidad de éstas para integrarse a embriones partenogenéticos utilizando diferentes metodologías. Los resultados obtenidos en este trabajo dan cuenta de que las ASC no se integran al embrión, como tampoco lo hacen los FFB. Estas células no se comportarían como las células madre embrionarias pluripotentes, capaces no solo de integrarse a un embrión sino de diferenciarse en todos los tejidos embrionarios (Cibelli y col., 1998b; Furusawa y col., 2013). Es posible que el origen restricto hacia mesodermo, torne a estas células capaces de integrarse a embriones más avanzados; o que sea necesaria su desdiferenciación previa a la complementación (Kobayashi y col., 2010).

Un resultado sorprendente que derivó del ensayo de complementación celular sugiere que el co-cultivo de embriones con un número discreto de células somáticas no adheridas a la placa, es decir sin formar monocapa, mejora las tasas de desarrollo *in vitro* de los embriones libres de ZP, cuando se emplean fibroblastos provenientes de un animal recién nacido. No se observan mejoras en el co-cultivo de ASC con embriones, a diferencia de lo recientemente reportado por Miranda y colaboradores (2006), en donde el co-cultivo de ASC y embriones resultó incluso mejor que el tradicional co-cultivo con células de la granulosa. Si bien los FFB no se integraron al embrión, sí sufrieron modificaciones por la presencia los mismos, formando agregados entre sí (figura 2.9). Ya ha sido demostrado que es posible reprogramar células a estados menos diferenciados por la simple exposición de éstas a un microambiente específico (Lee y col., 2013; Lim y Gong, 2013). Futuros estudios como el análisis del patrón de transcripción permitirían evaluar si el nicho establecido en el micropozo por el co-cultivo con embriones partenogenéticos es eficiente para alterar el estado de diferenciación de los FFB.

Sobre la base de los resultados obtenidos de la inducción de la diferenciación, así como de inmunotipificación reportados y de acuerdo con los criterios establecidos por la ISCT,

podemos confirmar que el protocolo establecido para el aislamiento y el cultivo de ASC permite, efectivamente, derivar células madre mesenquimales de animales adultos de manera sencilla y con bajo costo.

## 2.5 Conclusiones

- Mediante un procedimiento simple y económico se logró derivar células de tejido adiposo de un bovino adulto en pie
- ✓ El tratamiento de muestras de grasa subcutánea bovina con solución 0.60% P/V de Colagenasa tipo I en DPBS, suplementado con 0.25% de BSA resultó ser la condición más eficiente para recuperar células de tejido adiposo bovinas.
- La caracterización de las células por inmunotipificación y evaluación de su potencial multipotente permitió confirmar que se tratan de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- ✓ Las células derivadas de tejido adiposo no se integran a un embrión partenogenético cuando se co-cultivan en micropozos. Tampoco lo hacen los fibroblastos fetales bovinos, aunque cabe destacar que estos impulsan el desarrollo de los embriones partenogenéticos y, además, parecen sufrir modificaciones formando agregados entre sí.

Capítulo 3: Uso de células mesenquimales y agregación embrionaria en la producción de clones bovinos

### 3.1. Introducción

La transferencia nuclear de célula somática (SCNT) es una técnica de reproducción asistida que presenta gran potencial tanto a fines de investigación básica como aplicada. Esta técnica permite la reprogramación de células somáticas completamente diferenciadas a un estado totipotente (Revisado Ogura y col., 2013). Así, la SCNT posibilita la generación de copias idénticas de animales de alto valor genético y la preservación de genética de animales con problemas reproductivos, recientemente muertos o en peligro de extinción. Por otro lado, dado que es posible derivar células madre a partir de embriones clonados, su uso en medicina regenerativa es invaluable (Vajta, 2007). No menos importante es su utilidad a fines básicos, ya que permite estudiar mecanismos clave de reprogramación y pluripotencia. Por último, en la actualidad la SCNT es uno de los métodos de elección para producir animales domésticos genéticamente modificados, tales como vacas y cerdos, con genotipos novedosos para la industria pecuaria, farmacéutica o la biomedicina (Ogura y col., 2013; Salamone y col., 2006; Kues y Niemann, 2011; Prather, 2013; Wolf y col., 2014).

Desde el nacimiento de la oveja Dolly (Wilmut y col., 1997), el primer mamífero clonado a partir de una célula somática adulta, muchos laboratorios han empleado la SCNT para producir exitosamente clones de distintas especies, entre ellos se cuentan clones de cabras, vacas, ratones, cerdos y caballos (Cibelli y col., 1998; Baguisi y col., 1999; Wakayama y col., 1999; Onishi y col., 2000; Polejaeva y col., 2000; Gambini y col., 2014). Sin embargo, la eficiencia de la técnica continúa siendo extremadamente baja: se observa una alta frecuencia de pérdidas gestacionales y anomalías en los clones nacidos (Campbell y col., 2005; Wilmut y col., 2002; Han y col., 2003; Young y col., 1998) que, se presume, están asociadas a fallas en la placentación y patologías de la placenta durante la gestación (Chavatte-Palmer y col., 2012; de Sousa y col., 2012). Muchos autores sugieren que estas anomalías se deben a una deficiencia en la reprogramación de la célula donante (Yamanaka y col., 2011; Degrelle y col., 2012). Trabajos realizados en diferentes especies muestran que los embriones preimplantatorios clonados presentan un patrón de trascripción aberrante cuando se los compara con embriones producidos por fecundación in vitro (FIV) en condiciones similares (Wrenzycki y col., 2002; Matoba y col., 2011; Moro y col., 2015; Matoba y col., 2014; Boiani y col., 2003; Zhang y col., 2016; Buemo y col., 2016; Bui y col., 2009 ; Degrelle y col., 2012) que, de acuerdo con lo expuesto, podía deberse a la reprogramación deficiente de la célula somática.

En este sentido, se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar la eficiencia de la técnica y se demostró que mediante el empleo de células donantes con menor grado de diferenciación celular, tales como células fetales, células madre embrionarias (ESC) o incluso blastómeras, es posible obtener mayores tasas de embriones clonados en múltiples especies (Salamone y col., 2006, Ono y Kono, 2006, Hall y col., 2013; Revisado por Ogura y col., 2013). Hasta principios de este año, no había sido posible derivar cultivos de ESC bovinas, lo que significaba una gran limitante para esta propuesta; y si bien hoy están disponibles (Bogliotti y col., 2018), su cultivo implica el uso de medios complejos y costosos. Además, el uso de células derivadas de embriones y/o fetos como donantes para SCNT no es factible para la clonación de animales adultos con fenotipo deseado. Es así que las células mesenquimales adultas, y en particular las ASC, se presentan como una donante atractiva para la SCNT.

Además del uso de células poco diferenciadas, la agregación embrionaria se propone como una alternativa sencilla y accesible para mejorar la producción de embriones clonados. Esta estrategia consiste en cultivar 2 o más embriones libres de zona pelúcida en íntimo contacto, de forma que contribuyan a la formación de un único blastocisto final. Diferentes autores demostraron que la agregación de embriones producidos a partir de células con igual carga genética pero distinta epigenética, a causa de la reprogramación independiente de cada célula, resulta beneficioso no solo para el desarrollo de los mismos sino también para la producción de blastocistos de mejor calidad (Boiani y col., 2003; Park y col., 2002; Gambini y col., 2012; Moro y col., 2015; Buemo y col., 2016). Se cree que esta mejora sería consecuencia del aumento en el número de células al inicio del desarrollo, además de una "compensación epigenética" entre las estructuras agregadas (Eckardt y McLaughlin, 2004).

De forma independiente, tanto la agregación embrionaria como el uso de células mesenquimales, ya fueron estudiados en el bovino. Si bien la agregación de clones producidos por HMC resultó en una mejora en la tasa de blastocistos (Ribeiro y col., 2009), el cultivo *in vitro* de 3 clones de SCNT en íntimo contacto, por sí solo, no fue suficiente para mejorar las tasas de producción de blastocistos bovinos (Misica-Turner y col., 2007; Bang y col., 2015), aunque cabe aclarar que la metodología empleada fue

ligeramente diferente a la de este estudio, lo que podría sesgar la interpretación de los resultados.

Respecto al uso de células adultas con menor grado de diferenciación, la producción de clones bovinos a partir de células mesenquimales de animales adultos, entre ellos BMSC o ASC, tampoco evidenció mejoras en la producción *in vitro* de clones respecto del uso de FAB (Colleoni y col., 2005; da Silva y col., 2016). Resulta interesante que, aunque ninguna de las 2 estrategias mejoró la cantidad de clones producidos, ambas dieron lugar a una mejora en la calidad de los blastocistos bovinos producidos, medida como número de células totales, relación MCI/TE y corrección de la expresión aberrante de factores de transcripción específicos (da Silva y col., 2016; Picou y col., 2009; Bang y col., 2015). Estos mismos resultados, derivados del uso de MSC como donantes de núcleo fueron reportados para otras especies como caninos, cerdos y equinos (Oh y col., 2011; Li y col., 2013; Olivera y col., 2016). En este sentido, la combinación del uso de células mesenquimales como donante de núcleo junto con la estrategia de agregación embrionaria podría resultar en un efecto total más beneficioso para la producción de clones bovinos, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo. Es decir, teniendo en cuenta que la implantación implica una comunicación coordinada entre el embrión y el entorno materno y que la desregulación masiva de expresión de genes específicos de TE en blastocistos de clonación sería una de las principales causas que afectarían este proceso, la reprogramación facilitada por el uso de células con mayor plasticidad, junto con la compensación en los errores epigenéticos entre las blastómeras debido a la agregación embrionaria, permitiría causar un efecto sinérgico que dé lugar a la mejora del patrón de expresión aberrante reportado en los embriones de clonación traducido como un aumento en la cantidad y calidad de clones bovinos producidos.

Basado en lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso combinado de células donantes con menor grado de diferenciación junto con la agregación embrionaria sobre el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos producidos por SCNT y sobre la calidad de los blastocistos obtenidos.

### 3.2. Materiales y metodología

Las metodologías que se mencionan a continuación fueron empleadas para el desarrollo del presente capítulo y han sido descriptas previamente en el Capítulo 2: Punción folicular y colecta de complejos oocito-cúmulus (COCs), Maduración *in vitro* (MIV), Denudado de COCs y remoción de la ZP.

## 3.2.1. Diseño experimental

Con la finalidad de establecer si la utilización de células donantes con menor grado de diferenciación junto con la agregación embrionaria mejora el desarrollo *in vitro* de los embriones bovinos de clonación, se estableció el diseño experimental esquematizado en la Figura 3.1. Brevemente, se emplearon 2 tipos celulares de igual genética pero con distinto grado de diferenciación, ASC y FAB, como donantes de núcleo para la SCNT. Además, se evaluaron 2 formas distintas de cultivo *in vitro* que consistieron en ubicar un embrión por micropozo (Grupos 1X) o ubicar 2 embriones en íntimo contacto dentro de un mismo micropozo (Grupos 2X), estrategia que llamamos "Agregación embrionaria".



**Figura 3.1: Esquema resumido de SCNT y agregación embrionaria**. Luego de la fusión del ooplasto con células ASC o FAB, los embriones reconstruidos libres de ZP fueron ubicados en el sistema de micropozos de forma individual (ASC 1X o FAB 1X) o de a pares en un micropozo (ASC 2X o FAB 2X), y cultivados *in vitro* hasta día 7. Se realizaron controles partenogenéticos tanto para el cultivo 1X como 2X. ASC, células mesenquimales de tejido adiposo; FAB, fibroblastos adultos bovinos; ZP, zona pelúcida.

Se incluyeron controles de embriones partenogenéticos (PA) tanto para las formas de cultivo 1X como 2X. Se evaluó la tasa de desarrollo embrionario a día 2, 5 y 7 del cultivo.

Finalmente, para determinar el impacto de estas estrategias sobre la calidad de los embriones producidos, los blastocistos generados en 3 repeticiones independientes fueron conservados en RNAlater a -20°C para el análisis de su expresión génica por RTqPCR. Embriones producidos por 3 repeticiones independientes de FIV fueron incluidos como referencia para ensayar la calidad embrionaria.

# 3.2.2. Enucleación de oocitos maduros

Previo a la enucleación, grupos de 20 a 25 oocitos maduros y libres de ZP fueron incubados durante 30 min en gotas de 100 µl de SOFaa suplementado con Demecolcina (D1925, 4 µM), con el objetivo de generar una protrusión en la zona donde se ubica la metafase II (MII) e incrementar la fiabilidad de la enucleación. Inmediatamente luego del tratamiento con Demecolcina, los oocitos fueron teñidos en gotas de 100 µl de SOFaa suplementado con el colorante fluorescente bisbenzimida Hoechst 33342 (0,02 mg/ml) por 15 min, para poder visualizar la placa metafásica bajo exposición a luz UV. La enucleación se realizó de forma mecánica en gotas de 100 µl de TALP-H suplementado con 0.5 µg/ml de citocalasina B (C6762) y cubiertas con aceite mineral, por medio del uso de micropipetas y micromanipuladores hidráulicos (Narishige, Medical Systems, Great Neck, NY, USA) montados sobre un microscopio Nikon Eclipse TE-300 (Nikon, Melville, NY, USA). Se utilizó una pipeta con punta roma de 20 µm de diámetro para aspirar la protrusión formada por la Demecolcina y otra pipeta con el extremo cerrado de 80 µm de diámetro para manipular el oocito y permitir su enucleación. Mediante un pulso de luz UV se confirmó la remoción total de la placa metafásica, por observación de la misma en la aguja de enucleación (Figura 3.2), intentando minimizar la exposición. Los ooplastos generados fueron colocados en gotas de 100 µl de SOFaa, en incubadora hasta su utilización.



**Figura 3.2. Enucleación de oocito bovino libre de ZP.** Se observa la pipeta Holding a la izquierda del oocito y la pipeta de enucleación a la derecha. La placa metafásica (flecha roja), ubicada en la protrusión generada por la demecolcina, se observa por fluorescencia azul bajo luz UV por la tinción con DAPI. La enucleación se realiza de forma mecánica y se confirma la presencia del ADN en la pipeta. Aumento 200X

## 3.2.3. Preparación de la célula donante

Para emplearlas en el procedimiento de SCNT, se indujo la quiescencia de las células somáticas dejando el cultivo en 100% de confluencia por 2 a 4 días. Las células fueron levantadas 30 min antes de la fusión, por incubación con 0.05% Tripsina-EDTA (25300, Gibco) por 5 min. Luego la suspensión fue centrifugada a 1200 RPM durante 5 min, y el pellet fue resuspendido en DMEM fresco.

# *3.2.4. Transferencia nuclear de célula somática (SCNT)*

Previo a la SCNT, se preparó una placa conteniendo gotas de 100 µl de TALP-H y una gota central de 50 µl de fitohemaglutinina 1 mg/ml (PHA; L8754) disuelta en medio TCM-199, cubiertas por aceite mineral. En una de las gotas de TALP-H se ubicaron células somáticas recientemente resuspendidas, de forma tal que queden separadas entre

sí, mientras que en otra se ubicaron hasta 20 oopastos. Bajo lupa estereoscópica, se transfirió de forma individual un ooplasto a la gota de PHA durante 2 a 5 seg e inmediatamente se lo ubicó muy próximo a una célula somática individualizada, moviéndolo lentamente hasta poner sus membranas en contacto y permitir su adhesión. El par ooplasto-célula fue colocado en una placa conteniendo medio de fusión (0.3 M manitol, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mg/ml PVA) durante 30-60 seg y finalmente fue transferido a una cámara de fusión conteniendo 2 ml de medio de fusión precalentado, asegurándose que el plano de contacto de las membranas se ubique en paralelo a los electrodos (División de Instrumentos de BTX; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). La fusión de las membranas se realizó mediante 2 pulsos de 30 µs de Corriente Directa unidireccional de 75mV, separados entre sí por 0.1 s. Luego de la exposición al pulso eléctrico, los embriones reconstruidos fueron incubados de forma individual en microgotas de 5ul de SOFaa. La eficiencia de fusión fue evaluada luego de 30 minutos, tras determinar la presencia o ausencia de la célula en torno al ooplasto o en la base de la microgota. Cuando fue necesario se realizó una segunda fusión de los pares ooplastocélula. Las parejas fusionadas se consideraron embriones reconstituidos (ER) sin zona pelúcida, los cuales fueron incubados en las microgotas de SOFaa durante dos horas para permitir la reprogramación de la célula somática.

## 3.2.5. Activación química de embriones reconstruidos y/o oocitos

Luego de la reprogramación, los embriones reconstruidos fueron activados químicamente mediante tratamiento inicial con ionomicina (I24222; Invitrogen, California, USA) 5 µM durante 4 min en oscuridad, seguido de 2 lavados sucesivos con 2 ml de TALP-H. Inmediatamente luego del lavado, los embriones fueron ubicados en gotas de 5ul de SOFaa previamente calibrado contendiendo 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, D2629) 2 mM, cubiertas con aceite mineral e incubados durante 3 hs. Finalmente se realizaron 3 lavados sucesivos y exhaustivos con 2 ml de TALP-H, para remover la droga. Como control de la activación y del cultivo, oocitos maduros libres de ZP fueron activados partenogenéticamente utilizando el mismo protocolo descripto. Los embriones reconstruidos y pertenogenéticos fueron cultivados como se describe a continuación.

## 3.2.6. Cultivo de embriones y agregación embrionaria

Para el cultivo de embriones libres de ZP se utilizó el sistema de micropozos o "*Well* of the Well" previamente descripto en el capítulo 2 (sección 2.2.12 de materiales y métodos). Inmediatamente luego de la activación, los embriones fueron colocados en placas de cultivo con micropozos, siguiendo 2 estrategias distintas: se colocó un único embrión por micropozo (grupos 1X, embriones no agregados) o se ubicaron dos embriones tomados al azar en un mismo micropozo, en íntimo contacto entre sí (grupos 2X, embriones agregados). El número total de embriones reconstruidos ubicados en cada gota de 100 µl fue similar entre los grupos 1X y 2X. Los embriones fueron cultivados en una mezcla de gas humidificado (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub>) a 38.5 °C. La mitad del medio de cultivo fue renovado al día 2 del cultivo, es decir 2 días post activación (p.a.) momento en que fue registrado el clivaje de los embriones. Al día 5 p.a. se agregó SFB a las gotas de cultivo, a una concentración final de 10% P/V y se registró la formación de mórulas compactas. La formación de blastocistos se evaluó al día 7 y luego los embriones fueron almacenados en RNAlater (AM 7020, Ambion Co., Austin, TX, USA) para el estudio de expresión génica.

# 3.2.7. Producción de embriones por FIV

Para la producción de embriones por fecundación *in vitro* se siguió el protocolo desarrollado por Brackett y Oliphant (1975), con ligeras modificaciones. Las dosis seminales conservadas en nitrógeno líquido fueron descongeladas en un baño térmico a 37°C por 30 a 60 seg. El contenido de cada pajuela se descargó en 3 ml de solución de lavado precalentado (SWS, del inglés "*sperm wash solution*") y la suspensión fue centrifugada a 490 g por 5 min, descartando el sobrenadante. Este paso fue realizado por duplicado para eliminar completamente los crioprotectantes del semen. El pellet fue resuspendido en partes iguales de SWS y solución de dilución (SDS, del inglés "*sperm dilution solution*"), ajustando la concentración final de espermatozoides en 16 millones/ml. La co-incubación de las gametas se realizó durante 5 hs en estufa gaseada, en gotas de 100 ul de suspensión de espermatozoides con hasta 25 COCs por gota. Luego, los presuntos cigotos fueron tratados con hialuronidasa (H-4272) 1 mg/mL y sometidos a vortex durante 1 minuto para remover las células del cúmulus y los espermatozoides adheridos. Por último, fueron lavados 2 veces en medio TALP-H y cultivados en gotas

de 50 ul de SOFaa. Los embriones fueron recuperados a día 7 del cultivo *in vitro* y conservados en RNAlater a -20°C hasta su análisis.

## 3.2.8. Tinción de embriones con Mitotrackers

Inmediatamente luego de la activación, un grupo de clones bovinos libres de ZP fue incubado por 45 minutos en gotas de SOFaa conteniendo *Mitotracker* verde (20 mM, M7514, Invitrogen) mientras que otro grupo fue incubado en gotas de SOFaa conteniendo *Mitotracker* rojo (0,5 mM, M7512, Invitrogen), en incubadora con atmosfera humedecida a 38.5 °C. Luego de la incubación, los embriones fueron lavados 2 veces en TALP-H y cultivados en gotas de 100 ul de SOFaa en el sistema WOW (Vajta y col., 2000).

# 3.2.9. Análisis de la abundancia relativa de trascriptos por RTqPCR

Grupos de 5 blastocistos obtenidos de 3 réplicas biológicas fueron almacenados en freezer a -20°C en RNAlater (AM 7020, Ambion, Foster City, CA, USA) hasta el momento del análisis. Previo a su análisis, se removió el RNAlater por enjuague de los embriones en DPBS. El ARN total fue extraído empleando el kit Cells-to-cDNA TM II kit (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Además de los embriones de SCNT se incluyeron grupos de 5 blastocistos producidos por FIV que se emplearon como referencia.

La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó a partir de 10 µl del ARN total, empleando hexanucleótidos sintetizados al azar ("*random primers*") y la enzima M-MuLV (Ambion Co., Austin, TX), en un volumen final de 20 µl. Los parámetros de ciclado fueron 70°C por 3 min, seguido de 42°C por 60 min y finalmente 92°C por 10 min. Los ADNc fueron almacenados en freezer a -20°C hasta ser utilizados en las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR). El análisis por qPCR fue realizado por el método de la curva estándar, para evaluar la abundancia relativa de los transcriptos de *OCT4*, *SOX2, NANOG, CDX2* y *KRT18*, empleando *ACTINA* como control interno (Cuadro 2). La curva estándar se realizó para cada gen, empleando 8 diluciones seriadas de los productos de PCR que fueron previamente purificados desde gel de agarosa mediante el kit E.Z.N.A (Omega Biotek, Santiago, Chile) y cuantificados por espectrofotometría (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Para la qPCR, cada muestra fue analizada por duplicado (réplicas técnicas) en volumen final de 10 µl conteniendo 5 µl de SensiMixPlus SYBR Hi-ROX (Quantace Ltd., Berlin, Germany), 1 ul de cada oligonucleótido (10 pM), 2 µl de ADNc y cantidad suficiente de agua Milliq, empleando el equipo MX3000P Real-Time PCR device (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Gen	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Número de acceso	
OCT4	F· 5′ GGAGAGCATGTTCCTGCAGTGC 3′	05	NM_174580	
	R: 5' ACACTCGGACCACGTCCTTCTC 3'	95		
SOX2	F: 5' CGAGTGGAAACTTTTGTCCG 3'	101	NM_00110546	
	R: 5' GGTATTTATAATCCGGGTGTT 3'	101	3	
NANOG	F: 5' TTCCCTCCTCCATGGATCTG 3'	219	NM_00102534	
	R: 5' ATTTGCTGGAGACTGAGGTA 3'	219	4	
CDX2	F: 5' CCTGTGCGAGTGGATGCGGAAG 3'	230	XM 871005	
	R: 5' CCTTTGCTCTGCGGTTCT 3'	230	AWI_071005	
KRT18	F: 5' TCCATTTTGCCGCAGTGTTCCA 3'	153	XM_582930	
	R: 5' AGAGACAAAAGCCCGCCATGTT 3'			
ACTINA	F: 5' GGCCAACCGTGAGAAGATGACC 3'	06	BT030480.1	
	R: 5´ GAGGCATACAGGGACAGCACAG 3´	90		

**Cuadro 3.1. Oligonucleótidos empleados en RTqPCR de clones bovinos.** Genes analizados, secuencia de cebadores específicos, tamaño del producto y fuente de acceso en GenBank.

Pb, pares de bases; F, oligonucleótido forward; R, oligonucleótido reverse

## 3.2.10. Análisis estadístico

Cada experimento fue repetido al menos tres veces. Las diferencias en el desarrollo *in vitro* de los embriones se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher con un intervalo de confianza del 95%, empleando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. Se consideraron significativas aquellas diferencias con valor de p≤0.05.

### 3.3. Resultados

El presente capítulo tuvo como objetivo dilucidar si el uso de células donantes con menor grado de diferenciación junto con la agregación embrionaria mejora la eficiencia de la clonación en la especie bovina. Para ello, se evaluó el desarrollo y la calidad de los clones reconstruidos por SCNT a partir de células ASC o FAB a día 7 del cultivo *in vitro*.

## 3.3.1. Validación de la estrategia de agregación embrionaria en clones bovinos

El primer paso para llevar a cabo el objetivo propuesto fue validar si el cultivo en íntimo contacto de 2 embriones libres de ZP da lugar a la integración de las blastómeras para formar un blastocisto con contribución equivalente de los 2 embriones originales tanto al linaje del TE como del MCI. Para esto, se obtuvieron clones bovinos por SCNT empleando ASC como donantes de núcleo. Inmediatamente luego de la activación, un grupo de clones bovinos libres de ZP fue teñido con *Mitotracker* verde mientras que otro grupo fue teñido con Mitotracker rojo. Aleatoriamente, un clon verde y un clon rojo fueron ubicados juntos en un mismo micropozo y cultivados como se describiera previamente (sección 3.2.6. de materiales y métodos). Solo se consideraron agregados aquellos embriones en los que se registró clivaje de los 2 embriones iniciales, a día 2 del cultivo (Figura 3.3, C). La presencia de células con fluorescencia verde y/o roja bajo UV fue evaluada en blastocistos a día 7 del cultivo in vitro (Figura 3.3, B). En 17 de 18 blastocistos 2X evaluados se detectó la coexistencia de células rojas y verdes (94,4%). Los blastocistos no mostraron un patrón particular de coloración, sino que las células de uno y otro color se localizaron de forma homogénea en todo el blastocisto, contribuyendo tanto al establecimiento del TE como del MCI (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Evaluación de la estrategia de agregación embrionaria en clones bovinos ASC**. Un clon bovino marcado con *Mitotracker* verde y otro marcado con *Mitotracker* rojo fueron agregados inmediatamente luego de la activación (A). Se evaluó la presencia de células rojas (columna 2) y verdes (columna 3) en los blastocistos producidos a día 7. La agregación se consideró solo en los casos en que los dos embriones iniciales hubieran clivado (C).

# 3.3.2. Efecto del uso de ASC y agregación embrionaria en el desarrollo in vitro de embriones bovinos producidos por SCNT

Células ASC y FAB aisladas del mismo animal, fueron empleadas como donantes de núcleo para la producción de clones libres de ZP por SCNT. En todos los casos se emplearon cultivos con 6 pasajes o menos, para evitar posibles problemas asociados al cultivo prolongado.

Los clones fueron cultivados *in vitro* siguiendo 2 estrategias distintas: agregación embrionaria (2X) o cultivo individual (1X). El cuadro 3 detalla los resultados obtenidos para el desarrollo *in vitro* de clones bovinos evaluando tasas de clivaje, mórula y blastocisto a día 2, 5 y 7 del cultivo, respectivamente.

Cuando se comparó el uso de células donante con distinto grado de diferenciación, no se observaron diferencias en la tasa de clivaje de los embriones reconstruidos a partir de ASC respecto a FAB, independientemente de la estrategia de cultivo empleado, ya sea sin agregar (ASC1X vs FAB1X) o agregado (ASC2X vs FAB2X) (p>0,05). Tampoco se observaron diferencias respecto de la tasa de mórulas compactas a día 5, ni de blastocistos obtenidos al día 7 del cultivo *in vitro*, para estos grupos. Esto indica que el uso de células mesenquimales no mejora la eficiencia de clonación bovina, al menos en términos de tasa de producción *in vitro* de embriones preimplantatorios.

Al evaluar el efecto de la agregación de embriones, no se observaron diferencias en la tasa de clivaje entre los grupos 1X y 2X producidos a partir del mismo tipo de célula donante, tampoco entre éstos y los controles de activación partenogenética (PA). En cambio, la agregación de clones FAB sí mejora la tasa de producción de mórulas respecto al grupo sin agregar (FAB1X, p<0,05). Este resultado no se repite para los clones ASC, aunque puede detectarse una tendencia a mayor producción de mórulas 2X respecto 1X.

Finalmente, al evaluar la tasa de producción de blastocistos, tanto para clones ASC como FAB, puede observarse que si bien existe una tendencia a la mejora en la producción de blastocistos agregados (2X) respecto sin agregar (1X), ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

La agregación de embriones partenogenéticos mejoró las tasas de desarrollo *in vitro* tanto en el estadio de mórula [PA1X (57.5%) vs PA2X (84.6%)] como en el de blastocisto

[PA1X (32.2%) vs PA2X (69.2%)], (p <0,05). La estrategia de agregación no implicó el uso de oocitos adicionales ya que no se observan diferencias entre la producción de blastocistos por embrión reconstruido, para estos grupos [PA1X (32.2%) vs PA2X (34.6%)].

		· · · ·		D2	D5	D7		
Célula	Grupo	n de ER	n de embriones (µpozos)	Clivaje (%)*	Mórula (%)*	Blastocisto	% por ER	% por µpozos
FAB	1X	63	63	57 (90,4) <sup>a</sup>	18 (28,6) <sup>b</sup>	14	22,22 <sup>ab</sup>	22,22 <sup>ab</sup>
ASC	1X	177	177	158 (89,3) <sup>a</sup>	59 (33,3) <sup>b</sup>	37	20,90 <sup>a</sup>	20,90 <sup>b</sup>
-	PA 1X	121	121	113 (93,4) <sup>a</sup>	65 (57,5) <sup>a</sup>	39	32,23 <sup>bc</sup>	32,23 ª
FAB	2X	82	41	40 (97,6) <sup>a</sup>	22 (53,7) <sup>a</sup>	13	15,86 ª	31,70 <sup>ab</sup>
ASC	2X	154	77	69 (89,6) <sup>a</sup>	35 (45,5) <sup>ab</sup>	24	15,58 ª	31,17 <sup>ab</sup>
-	PA 2X	78	39	38 (97,4) <sup>a</sup>	33 (84,6) <sup>c</sup>	27	34,62 °	69,23 °

Cuadro 3.2. Efecto del uso de ASC y agregación embrionaria en el desarrollo in vitro de embriones bovinos producidos por SCNT

(a,b,c) Los valores con superíndices diferentes en una columna son significativamente diferentes (P<0.05, prueba de Fisher). \*Porcentajes calculados por n° de embriones (μpozos). D2, día 2 p.a.; D5, día 5 p.a.; D7, día 7 p.a.; ER, embriones reconstruidos y μpozos, micropozos.

# 3.3.3. Efecto del uso de células mesenquimales y agregación embrionaria sobre la calidad de clones bovinos producidos por SCNT

Si bien la tasa de producción de clones bovinos no se vio afectada por la estrategia de agregación y el uso de ASCs, resultó de interés estudiar la calidad de los embriones producidos, dado que una mejora de la calidad de los blastocistos podría tener un impacto positivo en la eficiencia de implantación de los mismos. Por tal motivo, se comparó la abundancia relativa de genes clave para el desarrollo de embriones preimplantatorios, empleando blastocistos clonados a partir de ASC o FAB, tanto agregados (2X) como sin agregar (1X), tomando como referencia embriones bovinos producidos por FIV.

Luego de la extracción de ARN y síntesis de ADNc, se realizó el análisis por qPCR, empleando el método de la curva standard. Se evaluó la expresión relativa tanto de genes asociados a la pluripotencia, como son *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*, como de marcadores de diferenciación a trofoblasto, específicamente *CDX2* y *KRT18*, utilizando el gen de Actina como control interno.

Los ensayos fueron realizados sobre 3 grupos independientes de 5 blastocistos cada uno, conservados en 100 ul de RNAlater a -20°C. Si bien tanto la extracción como síntesis de ADNc no supusieron inconvenientes, al analizar los resultados de expresión se observó que tanto para *NANOG* como para *CDX2*, no se registró amplificación alguna en las muestras analizadas, razón por la cual no se presentan los resultados. Además, muchas de las muestras no registraron amplificación para el control interno (*ACTINA*), por lo que tuvieron que ser descartadas del análisis. Es importante aclarar que debido a esto, los resultados así como la interpretación desprendida de ellos pudieran estar distorsionados.

No se detectaron diferencias significativas entre los genes analizados, sin embargo puede observarse una tendencia a la sobre expresión de *OCT4*, *SOX2* y *KRT18* en los embriones clonados sin agregar, respecto a los blastocistos agregados y FIV control (Figura 3.4).

Al evaluar el efecto de la célula donante en la calidad de los clones producidos, no se detectan diferencias ni tendencias entre los grupos ASC1X y FAB1X, tampoco entre ASC2X y FAB2X.





Figura 3.4. Abundancia relativa de transcriptos de *OCT4*, *SOX2* y *KRT18* en blastocistos bovinos de SCNT. Se evaluó la expresión génica en clones agregados (2X) y sin agregar (1X) producidos a partir de ASC o FAB. Los resultados se compararon con los de embriones bovinos producidos por FIV.

## 3.4. Discusión

Independientemente de la especie, las bajas tasas de desarrollo de clones han sido adjudicadas a una mala reprogramación del núcleo donante (revisado por Reik y col., 2001; y por Niemann y col., 2013). En este trabajo decidimos abordar esta problemática mediante el uso simultáneo de 2 estrategias: la utilización de células donantes de núcleo con menor grado de diferenciación, que facilite la reprogramación por parte del ooplasto (Ono y Kono, 2006) y la agregación embrionaria para compensar posibles fallas epigenéticas de los clones producidos (Eckardt y McLaughlin, 2004).

En un ensayo inicial, mediante el uso de tinción por *Mitotrackers*, validamos la estrategia de agregación embrionaria en bovinos. Nuestros resultados confirman que la estrategia de ubicar 2 clones bovinos libres de zona pelúcida en un mismo micropozo, inmediatamente luego de la activación, da lugar a la producción de un único blastocisto en el que no solo coexisten células de los 2 embriones originales, sino que éstas se entremezclan y distribuyen de forma homogénea en el blastocisto. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por nuestro laboratorio para la agregación de clones felinos (Moro y col., 2015) empleando *Mitotrackers*. Fue demostrado que la agregación de embriones en estadio de 8 células o más avanzados originan un blastocisto, pero en éste las células derivadas de cada embrión ocupan una posición espacial definida y no una distribución homogénea y combinada de las células derivadas de los distintos embriones (Wells col., 2000; Chrenek y col., 2008), lo que podría comprometer a la "compensación epigenética" esperada. Los resultados presentados demuestran que la estrategia empleada produce blastocistos con contribución equivalente de los embriones agregados a la formación tanto del TE como del MCI.

De la comparación de las tasas de blastocistos a día 7 p. a., hemos identificado solamente un incremento estadísticamente significativo en la producción de mórulas del grupo FAB2X respecto del grupo FAB1X, no detectándose diferencias para la producción de blastocistos, para ningún grupo de clones analizados. Si bien no se observó una mejora en la eficiencia de la técnica al emplear células con menor grado de diferenciación, como son las ASC, respecto al uso de células totalmente diferenciadas (FAB), el hecho de que la agregación resultara beneficiosa para mejorar las tasas de producción de mórulas de embriones reconstruidos con FAB, y no así de embriones de ASC, permite sospechar que las últimas son superiores en cuanto a su utilidad como donantes de núcleo para SCNT, ya que pueden sostener de forma aceptable el desarrollo de los clones individuales (1X), es decir no requieren de la cooperación de la agregación embrionaria. Este supuesto se apoya con lo reportado en cerdos, donde el uso de células mesenquimales mejora la eficiencia de la clonación (Faast y col., 2006).

En bovinos ya fue demostrado que la agregación embrionaria o el uso de células mesenquimales de forma independiente, no resultan suficientes para mejorar las tasas de producción de blastocistos bovinos (Misica-Turner y col., 2007; Bang y col., 2015; Colleoni y col., 2005; da Silva y col., 2016); sin embargo hasta la fecha no se había evaluado el uso de estas estrategias en simultáneo. Nuestros resultados permiten confirmar que, en referencia a la producción de blastocisto, no existe efecto sinérgico al usar células madre de tejido adiposo y agregación embrionaria para la producción de clones bovinos por SCNT, aunque no puede descartarse el que los blastocistos producidos tengan una mayor calidad y, en consecuencia, una mejor capacidad de desarrollo postimplantatorio. Un análisis más exhaustivo de la expresión de genes clave por secuenciación de alto rendimiento del ARN (RNAseq), así como la transferencia de los embrionaria y del uso de células menos diferenciadas en la eficiencia de la clonación.

Al evaluar puntualmente el efecto de la agregación sobre el desarrollo *in vitro* de los clones bovinos, hemos identificado una tendencia al incremento tanto de la producción de mórulas compactas como de blastocistos de embriones agregados (2X) respecto al control sin agregar (1X), tanto para ASC como para FAB. La agregación de embriones bovinos clonados ya había sido estudiada anteriormente, sin embargo la metodología experimental empleada en gran parte de los trabajos difirió de la utilizada en esta Tesis. Misica-Turner y col (2007), estudiaron los efectos de la agregación de 3 clones bovinos empleando microgotas en vez de micropozos para la agregación, lo que podría suponer una limitación tanto para la contención física como para la comunicación entre los embriones. En un estudio contemporáneo a esta tesis se realizó, también, la agregación de 3 clones bovinos reconstruidos a partir de células transgénicas, reportando nuevamente que la agregación no mejora la producción de clones (Bang y col., 2015); pero en dicho estudio la agregación fue realizada de forma tardía, usando embriones de 8 células (no cigotos como en nuestro caso), por lo que podría perderse parte de los beneficios de la estrategia, ya que hay reportes que indican que la organización espacial de las blastómeras en estadios tempranos (4 células), juega un papel importante en los procesos transcripcionales y de diferenciación de linaje (White y col., 2016; White y col., 2017). Nuestros resultados, realizando la agregación de cigotos en el sistema WOW, proporcionan soporte concluyente que la agregación de 2 clones bovinos producidos por SCNT no da lugar a un aumento en la producción de blastocistos, aun cuando se emplean células mesenquimales como donantes de núcleo.

Podría pensarse en la necesidad de agregar mayor número de clones ASC empleando el sistema WOW, para denotar diferencias. En este sentido, Gambini y colaboradores (2012 y 2014) realizaron 2 trabajos con clones equinos con el objetivo de determinar el número óptimo de estructuras a agregar para maximizar la eficiencia de la técnica, comparando el desarrollo *in vitro* de embriones sin agregar (1X) con el de los grupos 2X, 3X, 4X y 5X. Demostraron que todos los grupos agregados resultaron mejores que el control para la producción de blastocistos y, además, que el incremento de las tasas de blastocistos por embrión (micropozo) era proporcional al número de estructuras agregadas, excepto para la condición 5X donde se observó una disminución de la eficiencia. Esta correlación positiva entre el número de estructuras agregadas y el desarrollo embrionario no implicó el uso de mayor número de embriones. Sin embargo, un trabajo en bovinos pone en duda esta hipótesis reportando que clones 1X y 3X reconstruidos con células de cúmulus y agregados en el sistema WOW, no muestran diferencias en la producción de blastocistos (Akagi y col., 2011). Por el contrario, en equinos la agregación de 3 embriones reconstituidos producidos a partir de células mesenquimales de cordón umbilical, sí mejora la producción de blastocistos respecto del uso de agregación y fibroblastos como donantes de núcleo (Olivera y col., 2016). Cabe entonces la posibilidad de que, en clones bovinos de SCNT reconstruidos a partir de células mesenquimales, el número óptimo de estructuras a agregar para evidenciar un efecto sinérgico sea mayor a dos, y en ese caso se logre una mejora significativa en las tasas de producción de clones bovinos.

En conjunto, los resultados descriptos en este capítulo indican que no existe un efecto sinérgico de la agregación de clones producidos con células mesenquimales de tejido adiposo a nivel de la producción de blastocistos. El análisis del perfil de expresión por técnicas más exhaustivas como es RNAseq sería de gran utilidad para evaluar las diferencias en cuanto a la calidad de los blastocistos producidos por estas estrategias. Además, la posibilidad de realizar transferencias a hembras receptoras permitiría definir de forma precisa cuál de las estrategias resulta más eficiente para producir preñeces y nacimientos de crías sanas, que es el real objetivo de la clonación.

## **3.5.** Conclusiones

- ✓ La agregación de 2 embriones en un micropozo a día 0 del cultivo *in vitro* resulta en la producción de un único blastocisto con contribución equivalente de los 2 embriones originales.
- ✓ El uso de células ASC como donante de núcleo para SCNT o la agregación embrionaria en el sistema WOW no resultan suficientes para mejorar la producción de blastocistos bovinos; aunque los resultados obtenidos para la producción de mórulas indican que las ASC serían mejores donantes respecto a los FAB.
- ✓ El uso combinado de ASC y agregación de 2 embriones, no muestra un efecto sinérgico que resulte en la mayor producción de blastocitos por SCNT. No se descarta la mejor calidad de los embriones producidos y/o el mejor desempeño *in vivo*, luego de ser transferidos a hembras receptoras.
Capítulo 4: Aplicación del Sistema CRISPR/dCas9-VP160 en embriones bovinos para la modulación de la expresión de genes asociados a TE

#### 4.1. Introducción

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) es una herramienta sumamente valiosa; sin embargo, y aun cuando se la ha estudiado por más de 20 años, la eficiencia de la técnica continua siendo muy baja (Oback, 2009, Niemann y col., 2013). Los embriones bovinos de SCNT muestran una competencia deficiente para su desarrollo in vitro e in vivo y el 70% falla en el proceso de implantación al ser transferidos al útero de hembras receptoras (Smith y col., 2012). Como se describiera anteriormente, la ineficiente reprogramación de la célula donante es una de las principales causas desencadenantes de la expresión aberrante de genes clave para el desarrollo embrionario (Vajta y col., 2007; Chavatte-Palmer y col., 2012). Particularmente en bovinos, Biase y colaboradores (2016) realizaron un exhaustivo análisis del perfil de expresión génico de embriones pre y post implantatorios producidos por SCNT, empleando embriones de IA como control. Demostraron que sólo en el tejido extraembrionario de embriones preimplantatorios, más de 5000 genes presentan una expresión aberrante. Entre estos, 230 están asociados al desarrollo anormal del tejido extraembrionario y fallas en la implantación en la base de datos de KO murinos, lo que explicaría en gran parte las pérdidas gestacionales.

El éxito en el establecimiento de la preñez depende de una correcta diferenciación celular, para lo cual es necesaria una precisa sincronización en la expresión de factores de trascripción, tanto a nivel temporal como espacial (Revisado por Rossant, 2004). En este sentido, se ha demostrado que una diferenciación aberrante de las células del trofoblasto durante el desarrollo embrionario preimplantatorio origina fallas en la placentación y patologías de la placenta durante la gestación (Chavatte-Palmer y col., 2012; Chen y col., 2013; Knott y Paul, 2014), problemas frecuentemente asociados a la clonación. Para mejorar la eficiencia de la clonación, resulta esencial profundizar nuestros conocimientos respecto de las dinámicas de expresión génica necesarias para la diferenciación y el desarrollo embrionario, de modo de poder interpretar las alteraciones que tienen lugar en los embriones clonados y diseñar estrategias para corregir la expresión de estos genes, que potencialmente resulten en el aumento de la eficiencia de implantación de los mismos.

Mediante manipulación de la expresión génica o de la abundancia de ARNm específicos es posible modular vías regulatorias importantes y modificar, de esta forma,

el estado de diferenciación de una célula. Esto quedó demostrado con la reprogramación in vitro de células somáticas a través de la sobreexpresión de factores específicos de trascripción, como son OCT4, SOX2, c-MYC y KLF4, para originar células funcionalmente equivalentes a las ESC, las células madre inducidas (iPSC, del inglés "Induced Pluripotent Stem Cells", Takahashi y Yamanaka, 2006), y también, mediante la diferenciación dirigida de ESC hacia linajes específicos, a través de la sobre expresión de factores de transcripción determinados (Nishiyama y col., 2009; Tian y col., 2012). Estos estudios permitieron desentrañar algunos de los factores claves de la reprogramación celular y el mantenimiento del estado pluripotente (Hanna y col., 2010); sin embargo los eventos regulatorios involucrados en el proceso de reprogramación continúan siendo una interrogante. De todas formas, la posibilidad de modular la expresión génica de forma dirigida y gobernar el estado de diferenciación celular resulta sumamente interesante para el caso de embriones de SCNT, en particular bovinos y murinos, donde la expresión aberrante de genes da lugar a un incorrecto desarrollo del TE. Cabe destacar que, en estos casos, resulta importante el uso de estrategias que no impliquen modificación de la secuencia de ADN y/o el uso de ADN episomal que, aun siendo mínimo, presenta riesgo de integración.

El interés por gobernar y corregir el patrón de expresión aberrante en los embriones clonados existe, prácticamente, desde los albores de la técnica. En este sentido, se han empleado drogas que modifican el patrón epigenético general durante el desarrollo embrionario, como es el caso de la Tricostatina A y el Ácido Valproico. Esta estrategia fue evaluada tanto en clones bovinos y porcinos reportándose resultados contradictorios en ambas especies (Ding y col., 2008; Iager y col., 2008; Gonzalez-Muñoz y Cibelli, 2018), posiblemente debido a que inducen alteraciones epigenéticas globales, en numerosos sitios del genoma, de modo no controlado. En casos en que el objetivo es silenciar la expresión de genes específicos, una alternativa consiste en el uso de ARN de interferencia (ARNi). Estos han sido utilizados tradicionalmente para determinar la función biológica de genes específicos. En clones murinos, mediante el uso de ARNi se logró corregir la expresión ectópica del gen XIST y con ello se alcanzó una mejora de hasta 10 veces en la tasa de clones machos nacidos (Matoba y col., 2011), pero no así de hembras (Oikawa y col., 2013). Otro trabajo muy interesante reportó la microinyección de embriones bovinos generados por clonación con ARNi para silenciar la expresión de la DNA-metiltrasferasal (DNMT1), enzima responsable del mantenimiento de la metilación durante la replicación del ADN (Yamanaka y col., 2011). Mediante esta estrategia, fue posible una reducción temporal en los niveles de ARNm de *DNMT1* en estadios tempranos del desarrollo, que tuvo por consecuencia una mejora significativa en la producción de blastocistos bovinos generados por SCNT. Sin embargo, con la tecnología de ARNi solo es posible silenciar la expresión de un gen y no incrementarla de forma directa. Cuando el objetivo es aumentar la abundancia de ARNm particulares, es posible recurrir a la microinyección de ARNm exógenos sintetizados *in vitro*. Sin embargo, esta estrategia no permite reproducir las diferentes variantes ("splicing") que pueda tener dicho gen y mucho menos las proporciones adecuadas de cada variante. Así, surge la necesidad de diseñar y emplear estrategias que permitan regular la expresión de genes endógenos, de forma dirigida y precisa, y que sean útiles para su implementación en la producción de clones por SCNT y la corrección de la expresión aberrante de genes clave en el contexto genómico natural de la célula.

El reciente desarrollo de moduladores programables de la expresión génica dio la posibilidad de modificar la expresión de genes endógenos y, además, de regiones de ADN no codificantes. Estos moduladores programables funcionan como factores de trascripción artificiales que localizan secuencias únicas en el genoma y reclutan maquinaria activadora o represora de la transcripción, según su diseño, promoviendo la inducción o represión de la trascripción en el contexto propio de las células. Su diseño se basa en una proteína de reconocimiento de ADN sin función catalítica, a la que se fusionan dominios activadores o represores de la transcripción. Los primeros moduladores programables fueron diseñados en base a las proteínas de unión a ADN ZFN o TALEN (Beerli y col., 1998; Zhang y col., 2011). Si bien estos sistemas demostraron ser exitosos para inducir o reprimir la expresión de genes endógenos específicos en cultivos celulares, su utilización se vio limitada por los altos costos y la complejidad en su síntesis sumado al hecho de que su especificidad no puede predecirse de forma precisa. Los nuevos factores de trascripción artificiales diseñados en función a la tecnología CRISPR/Cas9 tienen como ventaja la gran versatilidad y bajo costo propio del sistema CRISPR, permitiendo alterar la expresión génica endógena de forma relativamente sencilla. Esta herramienta fue diseñada tras inactivar la nucleasa Cas9 mediante mutaciones específicas en sus dominios activos (Gilbert y col., 2013; Mali y col., 2013b; Maeder y col., 2013; Perez-Pinera y col., 2013), generando de esta forma una proteína de unión a ADN, programable mediante guías de ARN específicos. Esta nucleasa deficiente (dCas9) fue entonces fusionada a dominios activadores o represores de la transcripción dando lugar entonces a los moduladores de la expresión (ver figura 1.10, Capítulo 1). Respecto a la dCas9 activadora de la transcripción (sistema CRISPR-on), es sus primeras versiones, el uso de dominios simples de activación daba lugar a una pobre inducción de la expresión, significativamente menor respecto de los activadores del tipo TALEN (Gao y col., 2014). La incorporación de múltiples repeticiones en tándem de los dominios activadores, o de dominios diferentes de activación, permitió incrementar la eficiencia de inducción de los activadores sintéticos basados en CRISPR (Chavez y col., 2015). Estos sistemas se han utilizado de forma exitosa para inducir la expresión de genes endógenos en cultivos celulares de múltiples especies, logrando reprogramar las células para obtener iPSC (Kearns y col., 2014) o, a la inversa, para dirigir la diferenciación de iPSC o ESC e incluso de fibroblastos fetales hacia células con morfología neuronal o muscular (Chavez y col., 2015, Wei y col., 2016, Chakraborty y col., 2014). Estos sistemas actúan sobre la maquinaria endógena celular, proporcionando un mecanismo más controlado y constituyendo un método alternativo para modular la expresión génica.

Esta tesis reporta por primera vez la modulación de la expresión de genes endógenos de embriones preimplantatorios de mamífero, mediante el uso del sistema CRISPR-on. Con este propósito, se utilizó el sistema CRISPR/dCas9-VP160 para incrementar la expresión génica de CDX2, TFAP2C o SMARCA4 en embriones preimplantatorios. CDX2 es un factor de transcripción que participa del mantenimiento del TE en embriones de mamífero. Jedrusik y col (2008) microinyectaron 1 blastómera de un embrión murino de 2 células con ARNi o ARNm de CDX2 y evaluaron la localización de las blastómeras derivadas de éstas, en el blastocisto. Demostraron que la mayor parte de las blastómeras derivadas de la célula microinyectada con ARNi localizaron en el MCI mientras que lo contrario se observó para las blastómeras derivadas de la blastómera con incremento de CDX2. Esto demuestra que la modulación de la expresión de CDX2 en estadio de 2 células es suficiente para modificar la localización de las blastómeras en el blastocisto. Por otro lado, TFAP2c, tal como se describió en el Capítulo 1, es un factor de transcripción que promueve la diferenciación hacia el trofoectodermo al funcionar como un regulador clave de la transcripción localizada de CDX2, la polaridad celular y la represión de la señalización HIPPO dependiente de la posición. Aston y col (2010) reportaron la expresión deficiente de TFAP2C en embriones bovinos de SCNT cuando se lo compara con embriones de FIV, en el estadio de mórula. En tanto, SMARCA4 regula negativamente la expresión de *NANOG* mediante remodelación de la cromatina en células destinadas al TE, y es esencial para la implantación en la especie murina (Carey y col., 2015). Así, la manipulación de los niveles de expresión de los genes mencionados, mediada por el sistema CRISPR/dCas9-VP160, permitiría, por un lado, profundizar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos y genes que gobiernan la diferenciación del trofoblasto en bovinos y, por otro lado, controlar unos de los primeros eventos de diferenciación celular embrionaria induciendo el desarrollo del linaje del trofoblasto de una manera definida. Como prueba de concepto, diseñamos y aplicamos el sistema CRISPR/dCas9-VP160 en embriones bovinos producidos por FIV y embriones murinos producidos *in vivo*, para evaluar la eficiencia y utilidad del sistema. El fin último y a largo plazo de este trabajo es trasladarlo a la producción de corregir así las fallas de expresión.

# 4.2. Materiales y metodología

Sólo se detallarán los materiales y métodos que no hayan sido descriptos anteriormente. Las metodologías que se mencionan a continuación fueron empleadas para el desarrollo del presente capítulo y han sido descriptas en objetivos anteriores: Punción folicular y colección de COCs; Maduración *in vitro*; Denudado de COCs; Fertilización *in vitro*, Cultivo de embriones preimplantatorios.

# 4.2.1. Diseño experimental

La proteína dCas9 fusionada a 10 repeticiones en tándem del dominio activador VP16 (dCas9-VP160) fue utilizada como un activador programable de la expresión de genes endógenos. Los sgRNAs fueron diseñados y sintetizados *in vitro* para dirigir a la proteína dCas9-VP160 a la región promotora de los genes *SMARCA4*, *TFAP2C y CDX2*. Como validación de la síntesis y diseño del sistema, cigotos bovinos producidos por FIV fueron microinyectados con los ARNs correspondientes al sistema CRISPR/dCas9-VP160 y cultivados *in vitro*. Se evaluó la presencia de la proteína mediante imunofluorescencia a día 3 del cultivo *in vitro* y su capacidad para inducir la expresión de los genes seleccionados mediante RTqPCR a día 2, 4 y 7 (Figura 4.1). El efecto de este sistema sobre el desarrollo embrionario se evaluó estudiando por un lado la tasa de producción de embriones a día 7 y, por otro lado, ensayando la calidad de los blastocistos producidos por RTqPCR, sobre grupos de 5 embriones colectados en 3 repeticiones independientes.



Figura 4.1. Esquema experimental general de microinvección de cigotos con el sistema CRISPR. cultivo y análisis embrionario. microinvectados Embriones con dCas9-VP160 y mix de 4 guías específicos para SMARCA4. TFAP2C, fueron cultivados in vitro y recuperados a día 2, 4 y 7 para verificar el diseño y la eficiencia del sistema para inducir la expresión génica (A). El efecto del sistema sobre el desarrollo y la calidad de los embriones producidos se evaluó a día inyección 7 post **(B)**. IF. inmunofluorescencia; RTqPCR, Analisis de expresión génica por PCR cuantitativa.

4.2.2. Construcciones empleadas para el sistema CRISPR/dCas9-VP160:

El plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression que codifica para la proteína moduladora dCas9-VP160 fue amablemente provisto por Rudolf Jaenisch (Addgene, plásmido #48240, Cheng y col., 2013)

Para completar el sistema, se diseñaron guías para dirigir la proteína moduladora dCas9-VP160 a la región promotora de los genes blanco *TFAP2C o SMARCA4*, tanto para el modelo bovino como murino y *CDX2* bovino. Para el diseño de los sgRNA, se obtuvo la secuencia genómica de cada gen de interés desde Genbank en NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y para cada uno se seleccionó una región de aproximadamente 200pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1). En dicha secuencia, así como en su reversa complementaria, se identificaron todas aquellas secuencias de forma 5´-N<sub>20</sub>NGG-3´, cada una de las cuales fue contrastada contra el genoma bovino o murino, mediante la herramienta bioinformática BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) para detectar posibles interacciones inespecíficas de los potenciales guías (*off-targets*). Luego, para cada gen a estudiar se seleccionaron las

mejores 4 secuencias identificadas, teniendo en cuenta menor número de off-targets y menor estabilidad en la formación de homodímeros. Finalmente, se confirmó la correcta selección de las secuencias mediante la herramienta online de diseño de CRISPR del laboratorio del Dr. Zhang (http://CRISPR.mit.edu/) y las mismas fueron ordenadas a GENBIOTECH como oligonucleótidos doble hebra, solicitando la secuencia seleccionada y su reversa complementaria (llamadas de aquí en adelante Fw y Rv, respectivamente). Cabe destacar que para poder obtener los sgRNA completos (región complementaria y región de unión a la dCas9, llamada scaffold), fue necesario clonar de forma dirigida los oligonucleótidos doble hebra en el vector de expresión pUC57-sgRNA digerido con Bsal (amablemente cedido por el Dr. Xingxu Huang), que contiene el Scaffold (Shen y col., 2014). Para esto, en el diseño de los oligonucleótidos se les adicionaron una secuencia terminal específica en los extremos siguiendo la forma 5'-TAGGG-N<sub>20</sub>-3 para el oligonucleótido Fw y 5'-AAAC-N<sub>20</sub>C-3' para el oligonucleótido Rv. El esquema 4.2 resume el procedimiento de diseño de sgRNAs mientras que los cuadros 4 y 5 detallan las secuencias Fw específicas ( $N_{20}$ ) de los oligonucleótidos empleados.



Figura 4.2. Esquema para el diseño y clonado de los oligonucleótidos en el vector de expresión. A los oligonucleótidos diseñados para cada gen ( $N_{20}$ ) se les incorporó un extremo 5' específico, para favorecer la ligación con orientación específica en el plásmido pT7-sgDNA digerido con la enzima *BsaI*.

Abrev	Nombre guía	Secuencia Fw (N <sub>20</sub> , 5´- 3´)	Referencia GeneBank
S1	sgRNA_SMARCA4_1	tagggCGGGGGGCGCGGGCAGCGTG	
S2	sgRNA_SMARCA4_2	tagggAAGCGAGAGAGGGAGTTCG	GJ061069.1 Región 921295 -
S3	sgRNA_SMARCA4_3	tagggCACGCGCGCTAGGAGCGGA	1011460
<b>S</b> 4	sgRNA_SMARCA4_4	tagggTTGTCTGGGAGAGGTGGGT	
T1	sgRNA_TFAP2C_1	tagggTCCTTCTCATTAAGGCTCCC	
Т2	sgRNA_TFAP2C_2	tagggCTAGGCTGGGACTGGCTGG	AC_000170 Región
Т3	sgRNA_TFAP2C_3	tagggCGGAGACCCACGCTGCGTG	59903145 -
Т4	sgRNA_TFAP2C_4	tagggTGCGTGGTGAGGGTGACTGA	55512715
C1	sgRNA_CDX2_1	tagggATCACGTAAGGCCGCCGGCC	
C2	sgRNA_CDX2_2	tagggTTCCACTAGGCTGCAGAGGC	AC_000169.1 Región
С3	sgRNA_CDX2_3	taggGCCTCTGCAGCCTAGTGGAA	258513355- 32308306
C4	sgRNA_CDX2_4	taggGGGGAAGACCCGCCACCGGC	32300300

Cuadro 4.1. Secuencias específicas	(N <sub>20</sub> ) de los s	sgRNAs diseñados	para bovino.
------------------------------------	-----------------------------	------------------	--------------

Abrev, nombre abreviado

# Cuadro 4.2. Secuencias específicas (N20) de los sgRNAs diseñados para murino.

Abrev	Nombre guía	Secuencia Fw (N <sub>20</sub> , 5´- 3´)	Referencia GeneBank
Mm_S1	Mm_sgRNA_SMARCA4_1	tagggTACGCGTGCGCACAGCGAA	
Mm_S2	Mm_sgRNA_SMARCA4_2	tagggCGCGCAGAGAGCGGAAGGG	NC_000075.6 Región
Mm_S3	Mm_sgRNA_SMARCA4_3	tagggGCTGGCGCGCGCACGAGGC	2161510
Mm_S4	Mm_sgRNA_SMARCA4_4	tagggTACCTCCCAGGCACGAAACT	21704230
Mm_T1	Mm_sgRNA_TFAP2C_1	tagggACCCGAACGCCTTAATGGGA	
Mm_T2	Mm_sgRNA_TFAP2C_2	tagggAAATTATCATAACTCCTCCC	AL833787.8 Región
Mm_T3	Mm_sgRNA_TFAP2C_3	tagggTGCAGGACCAGGCGTCGCGA	172540000 -
Mm_T4	Mm_sgRNA_TFAP2C_4	tagggGCTAGGCAGGGACTGGCTGG	172558622

Abrev, nombre abreviado

El clonado de los oligonucleótidos en el vector de expresión se realizó en condiciones estándar. Brevemente, se digirieron al menos 5 µg de vector pUC57-sgRNA empleando la enzima de restricción Bsal (NEB) durante 2 hs a 37°C. El plásmido digerido fue purificado por electroforesis en gel de agarosa y la banda de ADN fue recuperada del gel empleando QIAquick Gel Extraction Kit (28704, Qiagen). En todo momento se minimizó la exposición a UV. Por otro lado, se realizó el apareamiento de los oligonucleótidos complementarios y la ligación de éstos al vector de expresión, colocando 1 µl de oligonucleótidos apareados (0,1 µM), 1X Buffer de ligasa, 1 µl de T4 DNA ligase Quick (NEB, 400 U/µl) y 1 µl de plásmido digerido y purificado por reacción. El producto de ligación fue empleado para transformar bacterias competentes. Los plásmidos fueron purificados de cultivos bacterianos líquidos generados a partir de colonias individuales, siguiendo el protocolo de mini-preparación estándar. Puesto que al ocurrir la ligación se pierde el sitio de restricción de Bsal, la digestión con Bsal se empleó como screening para seleccionar aquellas colonias que potencialmente tuvieran los oligonucleótidos clonados. Finalmente la correcta construcción de los sgRNA se confirmó por secuenciación empleando el método de Sanger (Unidad de Genómica. Instituto de Biotecnología -CICVyA. INTA Hurlingham).

#### 4.2.3. Transcripción in vitro (TIV) del sistema CRISPR/dCas9-VP160

Los plásmidos codificantes para los sgRNAs fueron digeridos durante 2 hs a 37°C empleando la enzima de restricción *DraI* y BSA 1X, en volumen final 100 µl. Cada producto de digestión fue tratado con RNAsecure (AM7005, Ambion) durante 20 min a 65 grados y purificado empleando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104). Para la reacción de TIV se utilizó el kit MEGAshortscript (Ambion, AM1354) siguiendo las especificaciones del proveedor y empleando al menos 500 ng de plásmido digerido y purificado como molde para la reacción. Los ARN sintetizados fueron purificados empleando MEGAclear Kit (Ambion, AM1908), resuspendidos en agua libre de RNasas y almacenados en freezer a -80°C hasta ser utilizados. El correcto tamaño de los sgRNas se confirmó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Para obtener el ARNm de dCas9-VP160, el plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression fue recuperado por miniprep, empleando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (27104, Qiagen) y utilizado como molde para la reacción de PCR se empleó la enzima de alta fidelidad *Q5 High fidelity DNA polymerase* 

(M0491s, NEB), un cebador Fw conteniendo la secuencia mínima del promotor T3 (AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA) y el cebador universal BGH Rv, de forma de obtener un amplicón con la secuencia codificante bajo el promotor T3 (Figura 4.3). Las condiciones de reacción de la PCR consistieron en una etapa de calentamiento (95 °C durante 2 min), seguida por 35 ciclos de amplificación: una etapa de calentamiento (95 °C durante 30 s); una de apareamiento (a 58 °C durante 30 s) y una final de extensión (68 °C por 5 min). El ciclo 36 introdujo un paso de extensión adicional a 68 °C durante 10 min. Se incluyó un control negativo con agua destilada. El producto de PCR fue tratado con RNAsecure (AM7005, Ambion) durante 20 min a 65 grados para inactivar posibles RNAsas y purificado empleando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104). Para la TIV, se empleó el kit Ambion T3 mMESSAGE mMACHINE mRNA transcription synthesis kit, con ligeras modificaciones. Brevemente, se preparó el mix de transcripción de acuerdo a lo detallado por el proveedor, pero se adicionó 1 ul de DMSO a la reacción final, de modo de reducir la formación de estructura secundaria del molde de ADN. La reacción se incubó por 3 hs e inmediatamente se realizó la degradación del molde de ADN mediante tratamiento con DNAsa Turbo por 15 minutos. Finalmente se adicionó el extremo PolyA necesario para la estabilidad de los ARNm, por tratamiento con la enzima E. coli Poly(A) Polimerasa (EPAP), incluida en el kit de transcripción. Finalmente, el ARNm fue purificado empleando RNeasy Mini Kit (Qiagen, NV, Germany, 74104), y almacenado en freezer a -80°C hasta ser empleado. La concentración de ARNm se cuantificó por espectrofotometría en Nanodrop (ND1000, Thermo Scientific).



Figura 4.3. Esquema de síntesis de ARNm codificante para dCas9-VP160. La secuencia correspondiente a dCas9-VP160 por amplificada fue PCR. empleando un cebador Fw conteniendo la secuencia mínima del promotor T3 de forma de obtener un amplicón con la secuencia codificante bajo el promotor T3. El producto de PCR obtenido fue utilizado como molde para la síntesis in vitro de ARN, empleando kits comerciales.

# 4.2.4. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

El tamaño del ARNm sintetizado fue determinado por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. Para esto se preparó, en campana de extracción, el buffer de electroforesis (MOPS 20 mM, Acetato de Sodio 5 mM, EDTA 1 mM y Formol 6% en agua autoclavada, pH7) que se mantuvo refrigerado a 4° C hasta su utilización. Previo a la preparación del gel, se limpió exhaustivamente la cuba, cama y peine de electroforesis por tratamiento con solución de SDS 1% durante toda la noche seguido de enjuague abundante con agua destilada. El gel de agarosa 1.2% se preparó cuidadosamente en campana para gases, la composición final fue MOPS 20 mM, Acetato de Sodio 5 mM, EDTA 1 mM y Formol 18%, en agua autoclavada. Para la electroforesis, 1 vol de muestra (conteniendo al menos 500 ng de ARNm) fue tratado con 3 volúmenes de Loading buffer II (incluido en el kit de TIV) y 0.1 µl de Bromuro de Etidio e incubado por 2.5 min a 70°C seguido de 1 min en hielo. La muestra fue sembrada en el gel desnaturalizante junto con un patrón de peso molecular de ARN (Millenium RNA Marker, AM7150, Ambion) y la electroforesis se realizó por 60 min a 70V, en frio. El gel fue revelado en

transiluminador de luz UV (Gel Doc, BioRad), para confirmar si el producto de TIV se corresponde con el tamaño esperado para dCas9-VP160, de 4700 pb.

#### 4.2.5. Microinyección intracitoplasmática de ARNs en embriones bovinos

Presuntos cigotos obtenidos por FIV fueron denudados de la misma forma que lo descripto para oocitos (Capítulo 2, apartado 3.2.4) con ligeras modificaciones. Brevemente, luego de la FIV los embriones fueron tratados con hialuronidasa (H-4272) 1 mg/mL por 1,5 min y enjuagados 2 veces en TALP-H. Luego fueron recuperados bajo lupa estereoscópica, donde se seleccionaron aquellos con al menos 1 CP.

Los embriones seleccionados fueron transferidos a gotas de 100  $\mu$ L de TALP-Hepes, donde fueron inyectados con 10 pl de mix de ARNs conteniendo ARNm de dCas9-VP160 (100 ng/ $\mu$ l) y mix de 4 guías (50 ng/ $\mu$ l) de *SMARCA4* o *TFAP2C*, según corresponda, diluidos en 10% de polivinilpirrolidona (PVP, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). El control de microinyección (SHAM) consistió en presuntos cigotos microinyectados con 100 ng/ $\mu$ l de dCas9-VP160 sin guías. Para la microinyección se empleó una pipeta de 9  $\mu$ m (HG-MIC-9UM, Origio Inc., Charlottesville, Dinamarca) y una pipeta de sujeción (MPH-MED-30, Origio Inc., Charlottesville, Dinamarca) ubicadas en inyectores de aceite (Narishige), acoplados al microscopio invertido. Luego de la microinyección, los embriones fueron cultivados en incubadora por 2, 4 y 7 días y almacenados en grupos de embriones tempranos (n=10) y blastocistos (n=5) en 10  $\mu$ l de RNAlater, para su posterior análisis por RTqPCR. Además, algunos embriones fueron fijados en paraformaldehido 4%, para estudios de inmunofluorescencia.

# 4.2.6. Microinyección intracitoplasmática de ARNs en embriones murinos

Todos los experimentos que involucraron animales fueron realizados de acuerdo con las guías de cuidado animal IACUC, en la Universidad de Michigan (MSU, East Lansing, USA) y siguiendo los rocedimientos descriptos previamente (Cao y col., 2015). Brevemente, los cigotos de ratón fueron colectados de hembras CF-1 previamente superovuladas y apareadas con machos B6D2F1 (Charles River Laboratories). El protocolo de superovulación consistió en la inyección intraperitoneal (IP) de 5UI de gonadotrofina coriónica equina seguida de la inyección IP con 5UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) a las 48 hs. La colecta de embriones se realizó a las 16-18 hs post inyección con hCG, en medio M2 (M7167, Sigma). Los embriones fueron microinyectados intracitoplasmáticamente con 100ng/µl de dCas9-VP160 y 100 ng/µl de mix de sgRNA, empleando microinyectores PL100 (Harvard Apparatus). Luego de la microinyección, los embriones fueron ubicados en gotas de 50 µl de medio cultivo KSOM (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) cubiertas por aceite mineral y cultivados *in vitro* por 3 a 5 días en atmosfera húmeda de 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. Luego del cultivo, los embriones fueron almacenados en pool de 10, en 20 µl de buffer de extracción del kit *PicoPure RNA isolation* (Arcturus, Mountain View, California) en freezer a -80°C o fijados en PFA 4% y conservados en heladera a 4°C hasta su utilización.

#### 4.2.7. Análisis de embriones por inmunofluorescencia

Los embriones fueron tratados con solución de pronasa (P-8811) 15 mg/ml en TALP-H, hasta observar la degradación total de la zona pelúcida. Luego, fueron fijados en paraformaldehído (PFA, F-1635) al 4% v/v durante 20 min, seguido de 3 lavados por 5 min en DPBS con BSA al 0.4% v/v. Los embriones fijados fueron almacenados en heladera a 4°C, en 100 ul de DPBS con BSA 0.4% y PFA 1% dentro de tubos tipo Eppendorf, hasta su utilización.

Los embriones libres de ZP y fijados fueron tratados con Tritón X-100 al 0.1% v/v en DPBS durante 15 min para permitir la permeabilización de la membrana y luego fueron enjuagados por 15 min en DPBS-BSA 0.4%. Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, los embriones fueron incubados en solución de bloqueo durante 60 min (DPBS suplementado con SFB 4% v/v y Tween 0.01% v/v) a temperatura ambiente. Luego, se realizó la incubación de los embriones con el anticuerpo primario adecuado (ver cuadro 6) diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Como control de especificidad, algunos embriones fueron incubados en 20 µl de solución de bloqueo sin anticuerpo primario (control negativo). Luego de 3 lavados de 15 min cada uno en solución de bloqueo, los embriones fueron incubaron con los anticuerpos secundarios (ver cuadro 6) por 60 min a 37°C, protegidos de la luz. Finalmente, los embriones fueron montados entre porta y cubreobjetos de vidrio, empleando solución de montaje VectaShield (conteniendo el colorante 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato - DAPI) y fueron almacenados a 4°C, hasta ser analizados en un microscopio de barrido confocal láser Nikon C.1 (IByME). Para la excitación del fluoróforo Alexa fluor 488, conjugado al anticuerpo secundario, se seleccionó una longitud de onda de 488 nm en un laser

Argón-ion. Los núcleos de las blastómeras se observaron por excitación/emisión de DAPI, intercalado en el ADN, en la longitud de onda 358/461 nm, respectivamente.

Grupo	Anticuerpo primario y	Anticuerpo Secundario y		
experimental	dilución	dilución		
Embriones murinos tempranos	IgG monoclonal de ratón para CRISPR/Cas9 4G10 (C15200216, Diagenode, NJ, USA). Dilución 1:300	Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, fusionado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11001) Dilución 1:1000		
Embriones bovinos tempranos	IgG policional de ratón anti-HA tag (ab9110, Abcam). Dilución 1:100.	Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, fusionado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11001) Dilución 1:1000		

Cuadro 4.3. Especificaciones de anticuerpos empleados en ensayos de inmunodetección de dCas9-VP160

IgG, Inmunoglobulina G

# 4.2.8. Extracción de ARN y análisis de expresión relativa de genes

El análisis de expresión relativa de genes se llevó a cabo por extracción de ARN total, transcripción reversa y PCR cuantitativa (RTqPCR) empleando el método ΔΔCt. Al menos 3 réplicas biológicas fueron analizadas, tanto para embriones tempranos como para blastocistos. Para el aislamiento de ARN, se empleó el kit PicoPure RNA isolation (Arcturus, Mountain View, CA) siguiendo las especificaciones del proveedor. La primera hebra de ADNc fue sintetizada en 20 µl finales, empleando la transcriptasa reversa SuperScript II (Life Technologies, Carlsbad, CA) y utilizada como molde para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo usando la mezcla PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (A25742, Thermo Fisher Scientific), en el equipo StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los genes analizados fueron SMARCA4, TFAP2C, SOX2, NANOG, CDX2, empleando ACTINA y GAPDH como controles internos (Cuadro 7). Para todos los genes, los cebadores Forward (F) y Reverse (R) empleados fueron diseñados de forma tal que reconozcan exones distintos del gen a estudiar, para evitar la amplificación a partir de posibles contaminaciones de ADN genómico y sintetizados por Macrogen, Korea. Junto con las muestras, se corrieron controles negativos, empleando agua como molde. Luego de cada qPCR se realizaron curvas de disociación para confirmar la amplificación de un único producto de PCR. Para todos los grupos, los embriones control de FIV se utilizaron como referencia y los valores se expresaron como la medias±SEM y se muestran como n veces de diferencia relativa respecto a este grupo control. El análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad prism versión 5.01, empleando la prueba de Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de p $\leq 0.05$ .

Gen	Secuencia (5'- 3')	Amplicón	Acceso/Referencia
TFAP2C	F: ATTCGCAAAGGTCCTATTTCCA R: TAGATGTAGAGCTGAGGAGGGA	139 pb	NM_001083748 Zhenhua y col., 2017
CDX2	F: AGACAAATACCGGGTCGTGT R: CTTTCCTTTGCTCTGCGGTT	168 pb	Lic. Suvá, Comunicación personal
GAPDH	F: TTCAACGGCACAGTCAAGG R: ACATACTCAGCACCAGCATCAC	119 pb	Khan y col., 2012
ACTB	F: GACATCCGCAAGGACCTCTA R: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205 pb	NM_173979 Canel y col., 2016.
SMARCA4	F: CTGCAGGAACGGGAATACAG R: CTGGAAGTTCAGCAGTCTGAG	140 pb	NM_001105614.1 Esta tesis
NANOG	F: TCCAGCAAATGCAAGAACTTTC R: TTACATTTCATTCTCTGGTTCTGGAA	88 pb	Wrenzycki y col., 2002

Cuadro 4.4. Oligonucleótidos empleados en ensayos de RTqPCR de embriones microinyectados

## 4.3. Resultados

Los ensayos descriptos en este capítulo fueron realizados con el propósito de profundizar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos y genes que gobiernan la diferenciación del trofoblasto en bovinos y desarrollar herramientas de biología molecular para modular la expresión de genes clave en la formación del TE en embriones preimplantatorios. El objetivo a largo plazo es utilizar estas herramientas para dirigir la diferenciación celular y contrarrestar las fallas en la placentación asociadas a la clonación por SCNT y otras técnicas de PIV de embriones. Con este objetivo, adaptamos la nueva tecnología CRISPR/dCas9-VP160 para modular la expresión de *SMARCA4, CDX2 y TFAP2C* y la evaluamos, como prueba de concepto, en embriones preimplantatorios bovinos de FIV estudiando la inducción de la expresión génica a día 2, 4 y 7 del cultivo *in vitro*.

Como complementación a los resultados obtenidos para el modelo bovino, evaluamos el sistema CRISPR/dCas9-VP160 en el modelo murino. Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Jason Knott, en el departamento de Ciencia Animal, MSU - USA, en el marco de una beca Fulbright-Ministerio de Educación y Deportes.

## 4.3.1. Confirmación del diseño y síntesis in vitro de dCas9-VP160

El primer paso para llevar a cabo el objetivo propuesto fue diseñar y sintetizar los componentes del sistema CRISPR/dCas9-VP160. Dado que en bovinos la actividad transcripcional es baja hasta la activación del genoma embrionario, en el estadio de 8 células (Hay-Schmidt y col., 2001; Barnes y First, 1991; Memili y First, 2000), se decidió trabajar con los ARN del sistema CRISPR de modo de asegurar su disponibilidad inmediatamente post inyección. Para esto, la secuencia codificante de dCas9-VP160 fue amplificada por PCR empleando una enzima termostable de alta fidelidad, de modo de minimizar la tasa de error. El producto de PCR fue empleado como molde para la síntesis *in vitro* del ARNm, valiéndose de la RNA polimerasa t3. El correcto tamaño del producto de transcripción fue confirmado tras analizar la muestra por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa 1,2% y comparar el tamaño con el marcador de pesos molecular de ARN Millenium (Ambion) (Figura 4.4). Para comprobar que el ARNm sintetizado codificaba para la proteína dCas9-VP160, embriones murinos y bovinos fueron inyectados con el ARNm de dCas9-VP160 y cultivados *in vitro* hasta el estadio de

8-16 células. Luego, fueron fijados en parafolmaldehído 4% y sometidos a análisis por inmunofluorescencia, empleando un anticuerpo monoclonal específico para la proteína dCas9-VP160 y un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo. La presencia de la proteína en el núcleo de las blastómeras murinas y bovinas confirmó que el ARNm sintetizado era reconocido por la maquinaria de traducción celular y efectivamente codificaba la proteína dCas9-VP160 (Figuras 4.5 y 4.6).



Figura 4.4. Evaluación del tamaño del ARNm por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. Se empleó un marcador de tamaño de ARN simple hebra para evaluar el tamaño del presunto ARNm codificante para dCas9-VP160. El tamaño del ARNm sintetizado coincide con lo reportados en bibliografía (4700pb)



**Figura 4.5. Inmunodetección de la proteína dCas9-VP160 en embriones murinos microinyectados.** En la primera columna se observan los núcleos de las blastómeras teñidos con DAPI (azul). En la segunda columna se observa la presencia de la proteína dCas9-VP160 en los núcleos de las blastómeras (A488, verde). El control negativo consistió en la incubación de embriones sólo con el anticuerpo secundario, confirmando la especificidad del anticuerpo por la proteína dCas9-VP160.



**Figura 4.6. Inmunodetección de la proteína dCas9-VP160 en embriones bovinos microinyectados.** En la primera columna se observan los núcleos de las blastómeras teñidos con DAPI (azul). En la segunda columna se observa la presencia de la proteína dCas9VP160 en los núcleos de las blastómeras (Anti\_HA y Anti\_IgG-A488, verde). La tercera columna muestra los embriones en campo claro. El control negativo consistió en la incubación de embriones sólo con el anticuerpo secundario, confirmando la especificidad del anticuerpo por la proteína dCas9VP160.

4.3.2. Efecto de la modulación de la expresión génica de CDX2 mediada por el sistema CRISPR/dCas9-VP160 en blastocistos bovinos

Una vez confirmada la correcta síntesis y traducción del activador programable en embriones bovinos, nos propusimos evaluar la efectividad de esta proteína para inducir la expresión de *CDX2* al co-inyectarla con guías específicos para tal fin. Para ello, presuntos cigotos bovinos producidos por FIV fueron microinyectados con ARNm codificante de dCas9-VP160 y mix de guías para dirigir a la proteína a la región promotora de *CDX2*. Se establecieron 3 grupos distintos de acuerdo a los sgRNAs inyectados (secuencias detalladas en el cuadro 4): mix conteniendo guías C1 y C2 (Grupo dCas9\_Cdx2A), mix conteniendo guías C3 y C4 (Grupo dCas9\_Cdx2B) y finalmente mix conteniendo los 4 sgRNAs (Grupo dCas9\_Cdx2Tot). Se incluyó, además, un control FIV sin inyectar. Los embriones fueron cultivados *in vitro* durante 7 días, momento en el que se comparó la tasa de producción de blastocisto entre los grupos (cuadro 8). La microinyección de embriones con las mezclas de guías A o B causa un detrimento en la producción de blastocistos respecto del control sin inyectar (p<0.05). A diferencia de estos, el grupo dCas9\_Cdx2Tot resultó en una producción de blastocistos equivalente al control sin inyectar.

Cuadro 4.5. Desarrollo de embriones microinyectados dCas9\_Cdx2A, dCas9\_Cdx2B y dCas9\_Cdx2Tot respecto de embriones FIV control.

Grupo	n	Clivaje	Blastocistos (%)
FIV	179	164	85 (47,5) <sup>a</sup>
dCas9_Cdx2A	86	73	27 (31,4) <sup>b</sup>
dCas9_Cdx2B	82	66	22 (26,8) <sup>b</sup>
dCas9_Cdx2Tot	176	139	69 (39,2) <sup>ab</sup>

(a,b) Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas (Test de Fisher, p<0.05).

Los blastocistos obtenidos fueron sometidos a análisis por RTqPCR para determinar el efecto de las distintas variantes de microinyección sobre la expresión de *CDX2*, empleando *ACTINA* como control interno. Los resultados se resumen en la figura 4.7: no se observaron diferencias en la abundancia relativa de los ARN mensajeros de *CDX2* para los grupos inyectados respecto al control sin inyectar (línea punteada). En base a estos resultados, la inyección con el ARNm codificante para CRISPR y sgRNAs dirigidos a *CDX2* no resulta en producción de blastocistos con expresión aumentada de *CDX2*.



Figura 4.7. Abundancia relativa de transcriptos de *CDX2* en blastocistos bovinos control o microinyectados: dCas9\_Cdx2A, dCas9\_Cdx2B y dCas9\_Cdx2Tot. Los resultados se expresan como n veces de diferencia respecto del control FIV (línea punteada).

4.3.3. Modulación de la expresión génica mediada por el sistema CRISPR/dCas9-VP160 en embriones bovinos tempranos

Sobre la base de los resultados obtenidos nos preguntamos si la ausencia de diferencias respecto de la abundancia de CDX2 en estadio de blastocisto se debe a que el sistema no es eficiente en embriones preimplantatorios o, quizás, a que el ARNm codificante para la proteína dCas9-VP160 ejerce su efecto activador en estadios más tempranos del desarrollo *in vitro*, próximo al momento en que es inyectado. Decidimos entonces emplear este sistema para inducir la expresión de genes que operan río arriba a CDX2, como son SMARCA4 y TFAP2C, que en condiciones normales se expresan en estadios tempranos del desarrollo y dan lugar a la regulación de la diferenciación a TE. Para ello, presuntos cigotos bovinos producidos por FIV fueron microinvectados con ARNm codificante de dCas9-VP160 y mix de 4 guías para dirigir al sistema a la región promotora de TFAP2C (Grupo dCas9\_TF) o SMARCA4 (Grupo dCas9\_SM). Con el objetivo de evaluar la cinética de inducción de la expresión de SMARCA4 y TFAP2C mediada por CRISPR, los embriones microinyectados fueron recuperados a día 2, 4 y 7 del cultivo in vitro para su análisis. Se incluyó, además, un control FIV sin inyectar. Mediante RTqPCR se midió la abundancia relativa de los ARN mensajeros de SMARCA4, TFAP2C, CDX2 y NANOG, empleando la media de GAPDH y ACTINA como control interno. Los resultados de expresión se resumen en la figura 4.8 y se reportan como "n" veces de diferencia respecto del control FIV (línea punteada).

Puede observarse que el grupo dCas9\_SM muestra una aumento significativo de la expresión tanto de *SMARCA4* como de *TFAP2C* y *CDX2* respecto al control FIV sin inyectar, a día 2 del cultivo *in vitro* (p<0.05). Sin embargo, a día 4 del cultivo no se detectan diferencias con el control, para ninguno de los genes estudiados en este grupo. Para el caso del grupo dCas9\_TF, no se detecta la inducción de la expresión de éste, como tampoco de aquellos genes río abajo. Sin embargo, se observa una tendencia a la inducción de la expresión de *CDX2* tanto a día 2 como a día 4 del cultivo. A día 7 del cultivo *in vitro* no se observaron diferencias en la abundancia relativa de los ARN mensajeros de *SMARCA4, TFAP2C y CDX2* para ninguno de los grupos analizados, de igual forma a lo observado anteriormente para la inducción de *CDX2*.

Estos resultados proporcionan evidencia de que el sistema CRISPR/dCas9-VP160 resulta exitoso para inducir la expresión de *SMARCA4* en estadio de 2 células. La inducción lograda es transitoria ya que en estadios más avanzados del desarrollo, como son día 4 y 7 del cultivo *in vitro*, no se observan efectos de inducción.



**Figura 4.8 Abundancia relativa de transcriptos en embriones bovinos control (línea punteada) o microinyectados con CRISPR-on.** Se evaluó la abundancia relativa de *SMARCA4, TFAP2C, NANOG* y *CDX2* en embriones del grupo dCas9\_SM (izquierda, barras rayadas) y dCas9\_TF (derecha, barras blancas) a los días 2, 4 y 7 del cultivo *in vitro*. Los resultados se expresan como n veces de diferencia respecto del control FIV (línea punteada). \* Diferencias significativas respecto al control FIV, t-test Mann Whitney p<0.05

4.3.4. Efecto del sistema CRISPR/dCas9-VP160 sobre el desarrollo de embriones bovinos inyectados

Luego de verificar que, efectivamente, a día 2 del cultivo in vitro, el sistema CRISPR/dCas9-VP160 induce una alteración en la expresión de genes clave para el desarrollo de embriones preimplantatorios cuando se emplean guías para SMARCA4 y TFAP2C, evaluamos el efecto de estos sistemas sobre el desarrollo in vitro de embriones bovinos. Con este propósito, presuntos cigotos bovinos producidos por FIV fueron microinyectados con los componentes del sistema CRISPR/dCas9-VP160 para inducir, por un lado, la expresión de SMARCA4 (grupo dCas9\_SM) y por otro, la expresión de TFAP2C (grupo dCas9 TF). Luego de la microinyección, los embriones fueron cultivados in vitro hasta el estadio de blastocisto. Los resultados del desarrollo se compararon con los obtenidos para el grupo control SHAM, que consistió en embriones FIV inyectados solo con dCas9-VP160. Este grupo se realizó para descartar el efecto de la manipulación de los embriones sobre el desarrollo embrionario que pueda enmascarar el efecto de la inducción de la expresión de SMARCA4 o TFAP2C. También se incluyó un grupo control FIV sin inyectar. Los resultados detallados en el cuadro 9 muestran que ni la microinyección en sí (SHAM vs FIV), ni la inducción de la expresión de TFAP2C o SMARCA4 afectan el clivaje de los embriones bovinos. Sin embargo se observa una mejora significativa en la tasa de mórulas a día 5, cuando se induce la expresión de SMARCA4 respecto del control SHAM. La producción de blastocistos no se vio modificada por el sistema CRISPR/dCas9-VP160 para la inducción de la expresión de SMARCA4 o TFAP2C respecto el control SHAM. No obstante, tomando como referencia el grupo control sin inyectar, se observa una disminución significativa de la producción de blastocistos al inducir la expresión de TFAP2C.

embriones FIV control.					
Grupo	n	Clivaje (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)	
SHAM	62	58 (93,5) <sup>a</sup>	36 (58,1) <sup>b</sup>	33 (53,2) <sup>ab</sup>	
FIV	137	124 (90,5) <sup>a</sup>	103 (75,2) <sup>a</sup>	74 (54,0) <sup>a</sup>	
dCas9_SM	169	156 (92,3) <sup>a</sup>	129 (76,3) <sup>a</sup>	89 (52,7) <sup>a</sup>	
dCas9_TF	172	155 (90,1) <sup>a</sup>	102 (59,3) <sup>b</sup>	70 (40,7) <sup>b</sup>	

Cuadro 4.6.	Desarrollo	de embriones	microinyectados	dCas9_	SM y dCas9_	TF respecto	o de
embriones F	IV control.						

(a,b) Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas (Test de Fisher, p < 0.05).

4.3.5. Modulación de la expresión génica en embriones murinos mediada por el sistema CRISPR/dCas9-VP160

Los cigotos murinos fueron recuperados luego del sacrificio de hembras preñadas y microinyectados con 100 ng/µl de dCas9-VP160 y 100 ng/ µl de mix de 4 sgRNAs diseñados para dirigir a la proteína a la región promotora de *SMARCA* (grupo Mm.dCas9\_SM) o *TFAP2C* (grupo Mm.dCas9\_TF). Un grupo sin inyectar fue incluido como control. Los embriones fueron cultivados *in vitro* y recuperados en el estadio de 4 células. Se realizaron 2 repeticiones independientes que fueron analizadas por RTqPCR, empleando el gen *UBTF* como referencia. Los resultados obtenidos para los grupos no mostraron diferencias respecto al control sin inyectar (Figura 4.9). Estos resultados permiten inferir que el sistema CRISPR/dCas9 evaluado no resulta efectivo para inducir la expresión temprana de *SMARCA4* o *TFAP2C*, por lo que es necesario diseñar y ensayar otros sgRNAs.



**Figura 4.9.** Abundancia relativa de transcriptos en embriones murinos control o microinyecctados. A) Expresión relativa de *SMARCA4* en embriones control sin inyectar (gris) vs dCas9\_SM (rayado). Expresión relativa de *TFAP2C* en embriones control sin inyectar (gris) vs dCas9\_TF (blanco). Los resultados se expresan como n veces de diferencia respecto del control.

## 4.4. Discusión

Los resultados presentados en este capítulo permiten proponer al sistema CRISPRdCas9-VP160 como un sistema valioso y de utilidad para modular la expresión de genes endógenos a tiempos cortos, en embriones bovinos preimplantatorios.

En su versión nucleasa, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido ampliamente adaptado para su utilización en células y embriones de mamífero y ha mostrado ser exitoso para la producción de organismos genéticamente editados en múltiples especies. Las versiones modificadas de CRISPR, entre ellas los activadores programables de la expresión, también han sido empleados de forma exitosa en células de mamífero, logrando incluso dirigir el estado de diferenciación de las células. Sin embargo, tras revisar la evidencia científica disponible, a la fecha no ha sido reportado su uso para la modulación de la expresión de genes endógenos en embriones. Cheng y colaboradores (2013) microinyectaron cigotos murinos con ADN codificante para dCas9-VP64, 7 sgRNAs y un plásmido reportero con GFP y confirmaron la utilidad del sistema para inducir la expresión del gen reportero en mórulas y blastocistos. Sin embargo, en este caso, la inducción de la expresión de GFP es facilitada por la presencia de alto número de copias del gen reportero, y no requiere la compleja interacción que ocurre entre factores de transcripción en el contexto genómico natural de la célula. Por tal motivo, si bien el trabajo de Cheng constituye un antecedente a la aplicación del sistema CRISPR-dCas9 en embriones, no asegura que el sistema fuera funcional para la activación de genes endógenos. Sobre la base de estos antecedentes, en este trabajo decidimos emplear el sistema CRIPR/dCas9-VP160 para modular la expresión de genes implicados en la diferenciación a TE en embriones bovinos y murinos, con el fin último de inducir la diferenciación de los embriones inyectados de forma controlada y predeterminada.

En un primer experimento, comprobamos la apropiada calidad de las herramientas generadas (medido como integridad del ARNm sintetizado) y la correcta traducción del ARNm dCas9-VP160 a proteína en el núcleo de blastómeras tanto de embriones murinos como bovinos. No solo demostramos que la proteína dCas9-Vp160 es traducida sino además, que la misma es detectable al menos hasta 3 días post inyección. En este sentido, trabajos previos han demostrado en células transfectadas con ARNm de Cas9 nucleasa (wt, del inglés "*wild type*"), que éste es estable por al menos 96 hs post transfección, sin verse afectada la abundancia de trascriptos de Cas9 wt, relativa a *GAPDH*, en este período

(Kouranova y col., 2016). Para el caso de embriones, Tu y colaboradores (2017) también confirmaron la presencia de la proteína Cas9 wt por inmunofluorescencia, 24 hs luego de microinyectar cigotos murinos con ARNm. Sin embargo, estos autores no hicieron un seguimiento de la proteína en el tiempo. En conjunto, nuestros resultados permiten confirmar la correcta síntesis y traducción de dCas9-VP164 en embriones murinos y bovinos y su estabilidad hasta, al menos, el día 3 del cultivo embrionario.

Una vez confirmada la correcta síntesis de dCas9-VP160, se estudió la eficiencia del sistema para inducir la expresión de CDX2, gen clave para el correcto desarrollo del TE. Para esto, se diseñaron 4 guías que fueron inyectados junto con el ARNm de Cas9, de a pares o juntos, en cigotos bovinos producidos por FIV. En nuestras manos y evaluado al día 7 del cultivo *in vitro*, el sistema no dio lugar a la inducción de la expresión de CDX2 y tampoco se detectaron diferencias en cuanto a la tasa de blastocitos producidos, en ninguno de los grupos analizados. Esto no implica que el sistema no sea eficiente, ya que existe la posibilidad de que, por un lado, los sgRNAs empleados en este trabajo no sean los adecuados o, por otro lado, que la inducción de la expresión se logre más temprano en el desarrollo. De esta forma, en un estadio tan avanzado como es el blastocisto, la expresión endógena propia de CDX2 podría enmascarar la activación previamente lograda. En consistencia con esto, gran parte de los trabajos que reportan la transfección de líneas celulares con moduladores basados en CRISPR, evalúan la inducción de la expresión de los genes endógenos a las 48 o 72 hs de la transducción, aun cuando utilizan ADN (Mali y col., 2013; Chavez y col., 2015). Si bien es claro que la eficiencia del sistema dependerá no solo del contexto celular sino de la accesibilidad de la región promotora en la arquitectura de la cromatina, estos trabajos sirven como referencia dada la falta de estudios respecto de la cinética de inducción de la expresión mediada por CRISPR en embriones. Nuestros resultados dan cuenta de que el sistema CRISPR/dCas9-VP160, empleando los guías C1-C4 diseñados en este trabajo, no da lugar a la inducción de la expresión de CDX2 en estadio de blastocisto.

En vista de la posible actividad "temprana" de dCas9-VP160 y debido a que en condiciones fisiológicas *CDX2* no se expresa en los primeros estadios del desarrollo, preferimos desistir de la inducción de *CDX2* y, en cambio, estudiar la inducción de la expresión de factores de transcripción que operan río arriba a *CDX2*, tales como *SMARCA4* y *TFAP2C*. Para inducir la expresión de *SMARCA4* y *TFAP2C* se diseñaron 4 guías específicos para cada región promotora, los que se inyectaron junto con ARNm

codificante para Cas9-VP160. La inducción de la expresión se evaluó a los días 2, 4 y 7 del cultivo *in vitro*, ya que, como se mencionó, se había comprobado la estabilidad de la proteína hasta día 3.

El sistema resultó eficiente para inducir la expresión de *SMARCA4* a día 2 del cultivo pero esta inducción no se mantuvo en el día 4. Por el contrario, para el caso de *TFAP2C* no se detectó un aumento significativo en la abundancia de transcriptos en ninguno de los momentos analizados. Un resultado inesperado fue la inducción de la expresión de *TFAP2C* a día 2, en el grupo inyectado con guías para *SMARCA4*. En este sentido, mediante análisis de células madre trofoblásticas murinas (TS) fue demostrado que TFAP2C y SMARCA4 se unen de forma simultánea a la región promotora de más de 600 genes, lo que sugiere una regulación coordinada entre estos factores de trascripción (Kidder y Palmer, 2010). La vía de regulación sinérgica propuesta por los autores, podría explicar la modulación de la expresión de *TFAP2C* sujeta a la expresión de *SMARCA4*, aunque deben realizarse análisis más detallados para confirmarlo.

Tal como esperábamos, la aplicación del sistema CRISPR-on no solo resultó en la modulación de los genes diana, sino también en la modulación de efectores río abajo de *SMARCA4* y *TFAP2C*, como es *CDX2* el cual es clave en el mantenimiento del TE (Cao y col., 2015, Choi y col., 2012; Aston y col., 2010). En este sentido, detectamos un incremento estadístico en la expresión de *CDX2* para el grupo dCas9\_SM a día 2 y, si bien no significativa, una tendencia marcada a la sobreexpresión de *CDX2* a día 2 en los embriones inyectados con dCas9\_TF (p=0.057). En el estadio de blastocisto, TFAP2C está restringido al TE y participa de la autoreplicación de las células (Choi y col., 2012; Aston y col., 2009). Embriones murinos con depleción de *TFAP2C* muestran una disminución de *CDX2* y fallan en la implantación, por lo que el fenotipo resulta letal (Cao y col., 2015). Los resultados obtenidos respecto a la inducción de *CDX2* en el grupo dCas9\_SM y la tendencia al aumento de *CDX2* en el grupo dCas9\_TF confirman, por un lado, la vía regulatoria conservada y, por otro lado, permiten sospechar la utilidad del sistema CRISPR/dCas9-VP160 para modular la expresión endógena en embriones bovinos preimplantatorios.

Dado que SMARCA4 y TFAP2C participan en la especificación a TE y que la expresión de *NANOG* se reprime en este linaje celular (Carey y col., 2015) presumimos que la sobreexpresión de los primeros llevaría a la represión de la expresión de *NANOG*.

Sin embargo, la microinyección de dCas9-VP160 con guías específicos para SMARCA4 y TFAP2C no dio lugar a un efecto significativo sobre la expresión de NANOG, aunque puede observarse una tendencia en aumento. Esto resultó sorpresivo, ya que el silenciamiento de NANOG mediado por SMARCA4 fue confirmado tanto en embriones murinos como porcinos (Carey y col., 2015; Magnani y Cabot, 2009). En efecto, la microinyección de ARNm de SMARCA4 en embriones partengenéticos de cerdo reprime totalmente la expresión de NANOG a las 48 hs. Además, no solo SMARCA4 regula la expresión de NANOG, sino que en ratón se demostró que existe una regulación cruzada entre NANOG y CDX2, en la que ambos factores de transcripción regulan negativamente la expresión del otro, por unión directa la región promotora (Chen y col., 2009). En este sentido, debido a la tendencia a la expresión aumentada de CDX2 sobre en este grupo, se esperaría la represión de la expresión de NANOG. Resulta interesante estudiar la posible existencia de una vía de retroalimentación, en la que la inducción de la expresión de CDX2 en estadios tempranos, en los que no debería haber ARNm, lleve a un aumento en la expresión de NANOG, en busca de silenciar y corregir esta expresión aberrante. Serán necesarios estudios adicionales para verificar la relevancia de este hallazgo.

Si bien en los ensayos realizados no se vio incrementada la producción *in vitro* de blastocistos, podría ocurrir que las alteraciones locales de expresión en genes maestros del desarrollo mejoren la capacidad de desarrollo *in vivo*, luego de la transferencia a receptoras sincronizadas. De hecho, Denicol y colaboradores (2014) demostraron que el tratamiento de morulas con DKK1, un inhibidor de la via regulatoria WNT implicada en el mantenimiento de la pluripotencia, no alteró la tasa de producción de blastocistos pero dio lugar al incremento en el número de células del TE, que se tradujo en un incremento estadístico en la tasa de preñez a día 32. Por esta razón, las herramientas propuestas en este trabajo deberían de ser también ensayadas *in vivo*, mediante la transferencia de embriones microinyectados en hembras receptoras sincronizadas y análisis de la tasa de preñez y nacimiento.

En conjunto, los resultados presentados permiten proponer al sistema CRISPR/dCas9-VP160 como una herramienta útil para la modulación de la expresión de genes endógenos en embriones bovinos en estadios tempranos. Resta comprobar que esta inducción en la expresión tenga efectos sostenidos sobre la diferenciación celular. Si este fuera el caso, la aplicación de este sistema en embriones producidos por SCNT permitiría corregir la expresión aberrante de genes que derivan en una diferenciación incorrecta del

TE, introduciendo nuevas estrategias para la corrección de a las fallas en la implantación y placentación de los clones. Considerando que una mejora en el TE podría derivar en un aumento en el reconocimiento materno-fetal, se estima que el sistema podría contribuir a la mejora en la placentación y, posiblemente, en las tasas de producción de crías vivas saludables.

# 4.5. Conclusiones

- ✓ El sistema CRISPR/dCas9-VP160 es efectivo para modular la expresión de SMARCA4 a tiempos cortos.
- ✓ Mediante la inducción de la expresión génica de SMARCA4 es posible modular la expresión de genes que operan río abajo, como es CDX2.
- ✓ El sistema CRISPR-on diseñado en esta tesis no resultó efectivo para inducir un aumento en la expresión de TFAP2C, sin embargo se detecta una tendencia al incremento en la abundancia relativa de CDX2 y de NANOG.
- ✓ Las herramientas ensayadas no dan lugar a una alteración en la producción de blastocistos *in vitro*, aunque no se descarta que exista un efecto positivo en la tasa de implantación y/o desarrollo a término de los embriones transferidos.

**Capítulo 5: Consideraciones generales** 

#### **Consideraciones generales**

El objetivo último del trabajo realizado en la presente Tesis fue mejorar la eficiencia de la clonación bovina haciendo uso de estrategias alternativas, pero complementarias. Inicialmente evaluamos la factibilidad de mejorar la clonación en bovinos mediante la utilización de células donantes con menor grado de diferenciación, en combinación con la agregación embrionaria. En una segunda instancia, diseñamos y validamos una novedosa estrategia que pretende mitigar las fallas en implantación de los clones. Para esto último, y como prueba de concepto, aplicamos el sistema CRISPR/dCas9-VP160 a embriones producidos por FIV, con el objetivo de inducir la expresión endógena de *CDX2, SMARCA4* o *TFAP2C*, para promover la diferenciación a trofoblasto. Esta novedosa estrategia, además de permitir el estudio y comprensión de las vías básicas de regulación de la diferenciación embrionaria, podría ser empleada para remediar las fallas en el desarrollo de embriones producidos por otras tecnologías, además de la SCNT, como es la ICSI.

En este sentido, en el segundo capítulo de esta tesis se describe un protocolo simple que fue empleado para el aislamiento de células con menor grado de diferenciación a partir de muestras de tejido adiposo subcutáneo. El carácter mesenquimal de estas células fue confirmado mediante inmunotipificación e inducción de la diferenciación hacia otros linajes mesodérmicos, como son adipogénico, condrogénico y osteogénico. De esta forma se verificó que el protocolo de aislamiento establecido es altamente eficiente, resultando en 80% de células mesenquimales de tejido adiposo (ASC). En este capítulo también se presenta una estrategia para evaluar la factibilidad de integración de las células aisladas a embriones partenogenéticos libres de ZP. Esta estrategia consistió en el cocultivo en micropozos y en íntimo contacto de embriones partenogenéticos y células somáticas, ya sean ASC o fibroblastos fetales bovinos (FFB), como alternativa para evaluar la plasticidad celular. A pesar de no detectarse integración, se observó un incremento en la tasa de blastocistos, al co-cultivar los embriones con FFB. Sorprendentemente, las células somáticas establecieron asociaciones entre durante el cocultivo, indicando que tanto los embriones como las células somáticas se ven afectados por el cultivo conjunto, presuntamente a través de factores secretados al medio por ambos tipos celulares. Ciertamente, la reprogramación celular mediada por el co-cultivo ya fue reportada (Lee y col., 2013) pero cabe destacar que el microambiente creado por el cultivo en íntimo contacto dentro del micropozo, tal y como lo evaluamos en este trabajo, podría
favorecer notablemente este proceso, ya que los cambios morfológicos en los FFB, así como la mejora en el desempeño *in vitro* de los embriones se logró solo en 2 días de co-cultivo. Resulta interesante profundizar en el estudio de este resultado.

Luego, las células ASC obtenidas fueron empleadas como donantes de núcleo para SCNT, utilizando células totalmente diferenciadas (fibroblastos adultos bovinios, FAB) y de igual genética como control. Así, se comparó la eficiencia de producción de blastocistos de los embriones recostruidos a partir de ASC o FAB, evaluando, además, el efecto del cultivo de embriones agregados en micropozos. Los resultados obtenidos se detallan en el capítulo 3 de esta Tesis y permiten confirmar que, en referencia a la producción de blastocistos, no existe efecto sinérgico del uso simultáneo de ambas estrategias, aunque no puede descartarse que, aun no detectándose diferencias en la tasa de producción *in vitro* de embriones, sí se detecten mejoras en la tasa de nacidos vivos. Por este motivo, sería de interés realizar la transferencia de estos embriones a hembras receptoras y evaluar su desempeño post-implantación. De todas formas, el hecho de que la agregación embrionaria mejora las tasas de producción de mórulas de embriones reconstruidos con FAB, y no de aquellos reconstruidos con ASC, permite sospechar que las últimas son superiores en cuanto a utilidad como donantes de núcleo. Por otro lado, en base a lo reportado para otras especies (Gambini y col., 2012), posiblemente sea necesario agregar un mayor número de clones para inducir un efecto sinérgico evidente como mayor tasa de clones bovinos.

Finalmente, en el tercer capítulo de esta Tesis se detalla una estrategia sumamente novedosa diseñada para corregir la expresión génica aberrante de embriones clonados y, de esta forma, mitigar las fallas en la implantación y placentación, pero que puede ser adaptada para modular la expresión de cualquier gen de interés. En particular, en este trabajo, empleamos el sistema CRISPR/dCas9-VP160 para inducir la expresión endógena de los genes *CDX2*, *SMARCA4* y *TFAP2C* y de esta forma gobernar la diferenciación a TE. En el contexto de que, a la fecha y bajo nuestro conocimiento, no existen reportes sobre el uso de este sistema para la modulación de la expresión de genes endógenos en embriones, se propuso evaluar la utilidad de la técnica en embriones producidos por FIV para luego trasladarla a la producción de clones. Mediante análisis por inmunofluorescencia se comprobó la correcta síntesis y traducción del ARNm codificante para dCas9-VP160 en embriones murinos y bovinos. Además, por ensayos de RTqPCR se comprobó que el sistema es eficiente para la inducción de la expresión de *SMARCA4* 

dos días luego de la microinyección y, en consecuencia, de la expresión de *CDX2*, aunque el efecto dejó de ser detectable a día 4 y 7 a nivel ARNm. Esto no descarta que haya una inducción en el nivel de proteína, lo cual está siendo actualmente explorado. Aun cuando no pudo evidenciarse una inducción de la expresión de *TFAP2C* mediada por CRISPR-on, fue posible detectar una tendencia al incremento en la abundancia de transcriptos de *NANOG* y de *CDX2*. Si bien este resultado fue inesperado, constituye un indicio de que la modulación en la expresión génica es efectiva, y no solo resulta en modificación de la expresión del gen diana, sino también de genes cuesta abajo y vías regulatorias. Estos resultados nos alientan a aplicar este sistema a embriones de SCNT, para mejorar la expresión de génica de los clones así como las tasas de implantación y producción de crías saludables y, también, adaptarla para su utilización en la producción de embriones por otra tecnología de avanzada, como es la ICSI.

En referencia al impacto que esta Tesis pueda tener sobre futuras investigaciones, destacan los conocimientos generados en cuanto a la modulación de la expresión de genes endógenos en embriones preimplantatorios. Esta estrategia, a nuestro saber, no tiene precedentes y podría ser adaptada no solo para el mejoramiento de clonación sino también, otros procesos y técnicas, como la inyección intracitoplasmática del espermatozoide, la cual es poco eficiente en el bovino, o incluso la activación partenogenética embrionaria. Por lo anteriormente descripto, consideramos que esta tesis constituye una pieza de investigación novedosa, y un gran aporte a la biotecnología animal, en particular a las técnicas de producción *in vitro* de embriones.

Bibliografía

## **Referencias Bibliográficas**

Akagi, S, Yamaguchi, D, Matsukawa, K, Mizutani, E, Hosoe, M, Adachi, N, Kubo, M, Takahashi, S. 2011. Developmental ability of somatic cell nuclear transferred embryos aggregated at the 8-cell stage or 16- to 32-cell stage in cattle. J Reprod Dev, 57(4):500-506.

Albarracín, JL, Morató, R, Izquierdo, D, Mogas, T. 2005. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. Theriogenology, 64 (8): 1740-55

Alberio, R, Zakhartchenko, V, Motlik, J, Wolf, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. Int J Dev Biol, 45(7): 797-809

Alberio, R. 2008. Aspectos Sanitarios de la Transferencia de Embriones. Biotecnología de la Reproducción, 201-221.

Al-Saqi, SH, Saliem, M, Asikainen, S, Quezada, HC, Ekblad, A, Hovatta, O, Le Blanc, K, Jonasson, AF, Götherström, C. 2014. Defined serum-free media for *in vitro* expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy, 16(7): 915-926.

Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. Reprod Biol Endocrinol. 12:78.

Aston, KI, Li, GP, Hicks, BA, Winger, QA, White, KL. 2009. Genetic reprogramming of transcription factor ap-2gamma in bovine somatic cell nuclear transfer preimplantation embryos and placentomes. Cloning Stem Cells, 11(1): 177-86.

Aston, KI, Li GP, Hicks BA, 2010. Abnormal levels of transcript abundance of developmentally important genes in various stages of preimplantation bovine somatic cell nuclear transferembryos. Cellular Reprogramming, 12 (1): 23–32.

Augustin, R, Pocar, P, Navarrete-Santos, A, Wrenzycki, C, Gandolfi, F, Niemann, H, Fischer, B. 2001. Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. Mol Reprod Dev, 60(3): 370-6.

Avilion, AA, Nicolis, SK, Pevny, LH, Perez, L, Vivian, N, Lovell-Badge, R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev, 17: 126–140.

Backer, F, Kanitz, W, Nürnberg, G, Kurth, J, Spitschak, M. 1996. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. Theriogenology, 46(6):999-1007.

Baglio, SR, Pegtel, DM, Baldini, N. 2012. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. Front Physiol, 3:359.

Baguisi, A, Behboodi, E, Melican, DT, Pollock, JS, Destrempes, MM, Cammuso, C, Williams, JL, Nims, SD, Porter, CA, Midura, P, Palacios, MJ, Ayres, SL, Denniston, RS, Hayes, ML, Ziomek, CA, Meade, HM, Godke, RA, Gavin, WG, Overström, EW,

Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat Biotechnol, 17(5):456-461.

Balbach, ST, Esteves, TC, Brink, T, Gentile, L, McLaughlin, KJ, Adjaye, JA, Boiani, M. 2010. Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. Dev Biol, 343(1-2):71-83.

Bang, JI, Jin, JI, Ghanem, N, Choi, BH, Fakruzzaman, M, Ha, AN, Lee, KL, Uhm, SJ, Ko, DH, Koo, BC, Lee, JG, Kong, IK. 2015. Theriogenology. 84(4):509-23.

Barba, M, Cicione, C, Bernardini, C, Michetti, F, Lattanzi, W. 2013. Adipose-Derived Mesenchymal Cells for Bone Regereneration: State of the Art. Biomed Res Int, 2013: 416391

Barnes, FL, Eyestone, WH. 1990. Early Cleavage and the Maternal Zygotic Transition in Bovine Embryos. Theriogenology, 33: 141-152

Barnes, FL, First NL. 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. Mol Reprod Dev, 29: 117-123.

Bazer, FW, Burghardt, RC, Johnson, GA, Spencer, TE, Wu, G. 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. Reprod Biol, 8: 179-211.

Bearden, RN, Huggins, SS, Cummings, KJ, Smith, R, Gregory, CA, Saunders, WB. 2017. In-vitro characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study. Stem Cell Res Ther, 8(1):218.

Bedell, VM, Wang, Y, Campbell, JM, Poshusta, TL, Starker, CG, Krug, RG 2nd, Tan, W, Penheiter, SG, Ma, AC, Leung, AY, Fahrenkrug, SC, Carlson, DF, Voytas, DF, Clark, KJ, Essner, JJ, Ekker, SC. 2012. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature, 491(7422):114-118.

Beerli, RR, Segal, DJ, Dreier, B, Barbas, CF. 1998. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB- 2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proc Natl Acad Sci USA, 95:14628-14633.

Beerli, RR, Dreier, B, Barbas, CF. 2000. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA, 97:1495-1500.

Beerli, RR y Barbas, CF III. 2002. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. Nat Biotechnol, 20 (2): 135–141

Berg, DK, Smith, CS, Pearton, DJ, Wells, DN, Broadhurst, R, Donnison, M, Pfeffer, PL. 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. Dev Cell, 20(2): 244-55.

Bevacqua, RJ, Fernandez-Martín, R, Savy, V, Canel, NG, Gismondi, MI, Kues, WA, Carlson, DF, Fahrenkrug, SC, Niemann, H, Taboga, OA, Ferraris, S, Salamone, DF.

2016. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. Theriogenology, 86(8):1886-1896

Bianco, P, Riminucci, M, Gronthos, S, Robey, P. 2001. Bone Marrow Stromal Cells: Nature, Biology, and Potencial Applications. Stem Cells, 19:180-192.

Biase, FH, Rabel, C, Guillomot, M, Hue, I, Andropolis, K, Olmstead, CA, Oliveira, R, Wallace, R, Le Bourhis, D, Richard, C, Campion, E, Chaulot-Talmon, A, Giraud-Delville, C, Taghouti, G, Jammes, H, Renard, JP, Sandra, O, Lewin, HA. 2016. Massive dysregulation of genes involved in cell signaling and placental development in cloned cattle conceptus and maternal endometrium. Proc Natl Acad Sci USA, 113(51):14492-14501.

Blomberg, LA, Telugu, BP. 2012. Twenty years of embryonic stem cell research in farm animals. Reprod Domest Anim, 47(4): 80-5.

Bó, GA, Baruselli, PS, Moreno, D, Cutaia, L, Caccia, M, Tríbulo, R, Tríbulo, H, Mapletoft, RJ. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology, 57(1):53-72.

Bogliotti, YS, Wu, J, Vilarino, M, Okamura, D, Soto, DA, Zhong, C, Sakurai, M, Sampaio, RV, Suzuki, K, Izpisua, Belmonte, JC, Ross, PJ. 2018. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. Proc Natl Acad Sci USA, 115(9):2090-2095.

Boiani, M, Eckardt, S, Scholer, HR, McLaughlin, KJ. 2002. Oct–4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. Genes Dev, 16:1209–1219.

Boiani, M, Eckardt, S, Leu, NA, Schöler, HR, McLaughlin, KJ. 2003. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? EMBO J, 22: 5304–5312.

Bolotin, A, Quinquis, B, Sorokin, A, Ehrlich, SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology, 151: 2551–2561

Bonab, MM, Alimoghaddam, K, Talebian, F, Ghaffari, SH, Ghavamzadeh, A y Nikbin, B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. BMC Cell Biol, 7:14-20.

Bosch, P, Pratt, SL, Stice, SL. 2006. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. Biol Reprod, 74(1): 46-57.

Bradley, A, Evans, M, Kaufman, MH Y Robertson, E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309: 255–256.

Briggs, R, King, TJ, 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 38(5): 455–463

Buemo, CP, Gambini, A, Moro, LN, Hiriart, MI, Fernández-Martín, R, Collas, P, Salamone DF. 2016. Embryo Aggregation in Pig Improves Cloning Efficiency and Embryo Quality. PLoS One, 11(2) :e0146390. doi:10.1371/journal.pone.0146390.

Bui, LC, Evsikov, AV, Khan, DR, Archilla, C, Peynot, N, Hénaut, A, Le Bourhis, D, Vignon, X, Renard, JP, Duranthon, V. 2009. Retrotransposon expression as a defining event of genome reprogramming in fertilized and cloned bovine embryos. Reprod, 138: 289-299

Bultman, SJ, Gebuhr, TC, Pan, H, Svoboda, P, Schultz, RM, Magnuson, T. 2006. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. Genes Dev, 20(13): 1744-1754.

Campagnoli, C, Roberts, IA, Kumar, S, Bennett, PR, Bellantuono, I, Fisk, NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/ progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood, 98(8): 2396–2402

Campbell, KH, McWhir, J, Ritchie, WA, Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380: 64-66.

Campbell, KH, Alberio, R, Choi, I, Fisher, P, Kelly, RD, Lee, JH, and Maalouf, W. 2005. Cloning: Eight Years After Dolly. Reprod Dom Anim, 40: 256–268.

Canel NG, Bevacqua RJ, Hiriart MI, Rabelo NC, de Almeida Camargo LS, Romanato M, de Calvo LP, Salamone DF. 2017. Sperm pretreatment with heparin and l-glutathione, sex-sorting, and double cryopreservation to improve intracytoplasmic sperm injection in bovine. Theriogenology, 93:62-70

Canel, NG, Suvá, M, Bevacqua, RJ, Arias, ME, Felmer, R, Salamone, DF. 2018. Improved embryo development using high cysteamine concentration during IVM and sperm co-culture with COCs previous to ICSI in bovine. Theriogenology, 117: 26-33.

Cao, Z, Carey, TS, Ganguly, A, Wilson, CA, Paul, S, Knott, JG. 2015. Transcription factor AP- $2\gamma$  induces early Cdx2 expression and represses HIPPO signaling to specify the trophectoderm lineage. Development, 42(9):1606-1615

Carey, TS, Cao, Z, Choi, I, Ganguly, A, Wilson, CA, Paul, S, Knott, JG. 2015. BRG1 Governs Nanog Transcription in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells via Antagonism of Histone H3 Lysine 9/14 Acetylation. Mol Cell Biol, 35(24):4158-4169.

Carlson, DF, Tan, W, Lillico, SG, Stverakova, D, Proudfoot, C, Christian, M, Voytas, DF, Long, CR, Whitelaw, CB, Fahrenkrug, SC. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proc Natl Acad Sci USA, 109(43): 17382-7.

Chakraborty, S, Ji, H, Kabadi, AM, Gersbach, CA, Christoforou, N y Leong, KW. 2014. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. Stem Cell Reports, 3: 940–947.

Chavatte-Palmer, P, Camous, S, Jammes, H, Le Cleac'h, N, Guillomot, M, Lee, RS. 2012. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. Placenta, 33: 99-104.

Chavez, A, Scheiman, J, Vora, S, Pruitt, BW, Tuttle, Iyer E, PR, Lin, S, Kiani, S, Guzman, CD, Wiegand, DJ. 2015. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nat Methods, 12 (4): 326-328

Chavez, A, Tuttle, M, Pruitt, BW, Ewen-Campen, B, Chari, R, Ter-Ovanesyan, D, Haque, SJ, Cecchi, RJ, Kowal, EJK, Buchthal, J, Housden, BE, Perrimon, N, Collins, JJ, Church, G. 2016. Comparison of Cas9 activators in multiple species. Nat Methods, 13(7): 563-567.

Chen, L, Yabuuchi, A, Eminli, S, Takeuchi, A, Lu, CW, Hochedlinger, K, Daley, GQ. 2009. Cross-regulation of the Nanog and Cdx2 promoters. Cell Res, 19(9):1052-1061.

Cheng, AW, Wang, H, Yang, H, Shi, L, Katz, Y, Theunissen, TW, Rangarajan, S, Shivalila, CS, Dadon, DB, y Jaenisch, R. 2013. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. Cell Res, 23: 1163–1171.

Chesne, P, Adenot, PG, Viglietta, C, Baratte, M, Boulanger, L, Renard, JP. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nat Biotechnol,20:366-369.

Choi, I, Carey, TS, Wilson, CA, Knott, JG. 2012. Transcription factor AP-2gamma is a core regulator of tight junction biogenesis and cavity formation during mouse early embryogenesis. Development, 139: 4623-4632.

Chrenek, P, Makarevich, AV, Bauer, M, y Jurcik, R. 2008. Developmental rate and allocation of transgenic cells in rabbit chimeric embryos. Zygote, 16(01): 87–91.

Chung, YG, Mann, MR, Bartolomei, MS, Latham, KE. 2002. Nuclear-cytoplasmic `tug of war' during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos. Biol Reprod, 66:1178-1184.

Cibelli, JB, Stice, SL, Golueke, PJ, Kane, JJ, Jerry, J, Blackwell, C, Ponce de León, FA, Robl, JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science, 280:1256–1258.

Cibelli, JB, Stice, SL, Golueke, PJ, Kane, JJ, Jerry, J, Blackwell, C, Ponce de Leon, FA, Robl JM. 1998b. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cellderived stem-like cells. Nat Biotechnol, 16:642–646.

Cibelli, JB, Campbell, KH, Seidel, GE, West, MD, y Lanza, RP. 2002. The health profile of cloned animals. Nature Biotechnology, 20(1): 13–14.

Colazo MG y Mapletoff RJ. 2013. A review of current timed-IA (TAI) programs for breed and dairy cattle. Can Vet J, 55(8): 772-80.

Colleoni, S, Donofrio, G, Lagutina, I, Duchi, R, Galli, C, Lazzari, G. 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. Cloning Stem Cells, 7(3):154-66.

Cong, L, Ran, FA, Cox, D, Lin, S, Barretto, R, Habib, N, Hsu, PD, Wu, X, Jiang, W, Marraffini, LA, Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339(6121): 819–823

Crispo, M, Mulet, AP, Tesson, L, Barrera, N, Cuadro, F, dos Santos-Neto, PC, Nguyen, TH, Crénéguy, A, Brusselle, L, Anegón, I, Menchaca, A. 2015. Efficient

Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. PLoS ONE, 10(8):e0136690. doi: 10.1371/journal.pone.0136690.

da Silva, CG, Martins, CF, Cardoso, TC, da Cunha, ER, Bessler, HC, Martins, GH, Pivato, I, Báo, SN. 2016. Production of Bovine Embryos and Calves Cloned by Nuclear Transfer Using Mesenchymal Stem Cells from Amniotic Fluid and Adipose Tissue. Cell Reprogram, 18(2): 127-36.

De Sousa, PA, King, T, Harkness, L, Young, LE, Walker, SK, Wilmut, I. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. Biol Reprod, 65: 23–30.

Degrelle, SA, Campion, E, Cabau, C, Piumi, F, Reinaud, P, Richard, C, Renard, JP, Hue, I. 2005. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. Dev Biol, 288:448-460.

Degrelle, SA, Jaffrezic, F, Campion, E, Le Cao, KA, Le Bourhis, D, Richard, C, Rodde, N, Fleurot, R, Everts, RE, Lecardonnel, J, Heyman, Y, Vignon, X, Yang, X, Tian, XC, Lewin, HA, Renard, JP, Hue, I. 2012. Uncoupled embryonic and extra-embryonic tissues compromise blastocyst development after somatic cell nuclear transfer. PLoS One, 7(6):e38309. doi: 10.1371/journal.pone.0038309.

Dekkers, JC. 1992. Structure of breeding programs to capitalize on reproductive technology for genetic improvement. J Dairy Sci, 75(10):2880-91.

Denicol, AC, Block, J, Kelley, DE, Pohler, KG, Dobbs, KB, Mortensen, CJ, Ortega, MS, Hansen, PJ. 2014. The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage commitment and promotes survival of the preimplantation embryo. FASEB J;28(9):3975-86.

Ding, X, Wang, Y, Zhang, D, Wang, Y, Guo, Z, Zhang, Y. 2008. Increased preimplantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2\_-deoxycytidine and trichostatin A. Theriogenology, 70 (4): 622–630.

Donovan, PJ, Gearhart, J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. Nature, 414(6859): 92-97. Review.

Eckardt, S, McLaughlin, KJ. 2004. Interpretation of reprogramming to predict the success of somatic cell cloning. Anim Reprod Sci, 82–83:97–108

Enright, BP, Kubota, C, Yang, X, Tian, XC. 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned fromdonor cells treated by trichostatin A or 5-aza-20-deoxycytidine. Biol. Reprod, 69: 896-901.

Eppig, JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction, 122: 829-838.

Evans, MJ y Kaufman, MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292: 154–156.

Faast, R, Harrison, SJ, Beebe, LF, McIlfatrick, SM, Ashman, RJ, Nottle, MB. 2006. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. Cloning Stem Cells, 8(3):166-73.

Fissore, RA, Dobrinsky, JR, Balise, JJ, Duby, R, Robl, J. 1992. Patterns of intracellular Ca2+ concentrations in fertilised bovine eggs. Biol Reprod, 47: 960-969.

Friedenstein, AJ. 1961. Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. Acta anatómica, 45: 31–59.

Friedenstein, AJ, Chailakhyan, RK, Latsinik, NV, Panasyuk, AF, Keiliss-Borok, IV. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplantation, 17: 331–340.

Furusawa, T, Ohkoshi, K, Kimura, K, Matsuyama, S, Akagi, S, Kaneda, M, Ikeda, M, Hosoe, M, Kizaki, K, Tokunaga, T. 2013. Characteristics of bovine inner cell massderived cell lines and their fate in chimeric conceptuses. Biol Reprod, 89(2):28

Gambini, A, Jarazo, J, Olivera, R, Salamone, DF. 2012. Equine cloning: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. Biol Reprod, 87(1): 1-9.

Gambini, A, De Stefano, A, Bevacqua, RJ, Karlanian, F, Salamone, DF. 2014. The aggregation of four reconstructed zygotes is the limit to improve the developmental competence of cloned equine embryos. PLoS One, 9(11):e110998. doi: 10.1371/journal.pone.0110998.

Gao, F, Chiu, SM, Motan, DA, Zhang, Z, Chen, L, Ji, HL, Tse, HF, Fu, QL, Lian, Q. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. Cell Death Dis, 7: e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.

Gao, X, Tsang, JCH, Gaba, F, Wu, D, Lu, L, y Liu, P. 2014. Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. Nucleic Acids Research, 42(20):e155. doi: 10.1093/nar/gku836.

Gardner, L. 1968. Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. Nature, 220: 596-597.

Gilbert, LA, Larson, MH, Morsut, L, Liu, Z, Brar, GA, Torres, SE, Stern-Ginossar, N, Brandman, O, Whitehead, EH, Doudna, JA, Lim, WA, Weissman, JS, Qi, LS. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell, 154: 442–451.

Gilchrist, RB, Ritter, LJ, Armstrong, DT. 2004. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. Animal Reproduction Science, 82–83; 431–446

Gilchrist, RBy Thompson, JG. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. Theriogenology, 67: 6–15

Gonzalez-Munoz E, Cibelli JB. 2018. Somatic Cell Reprogramming Informed by the Oocyte. Stem Cells Dev, 27(13):871-887.

Graf, A, Krebs, S, Heininen-Brown, M, Zakhartchenko, V, Blum, H, Wolf, E. 2014. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. Anim Reprod Sci, 149 (1-2): 46-58.

Gurdon, JB. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J Embryol Exp Morphol, 10: 622–640.

Halfon, S, Abramov, N, Grinblat, B, Ginis, I. 2011. Markers Distinguishing Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts Are Downregulated with Passaging. Stem Cells Dev, 20(1):53-66.

Hall, JE. Capítulo 412: Trastornos del aparato reproductor femenino. 2016. En Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J., Loscalzo, J. Harrison. Principios de Medicina Interna, (19ed). Mc Graw-Hill Interamericana Editores. ISBN 978-607-15-1335-9

Hall, V, Hinrichs, K, Lazzari, G, Betts, DH, Hyttel, P. 2013. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. Vet J, 197(2):128-42.

Han, YM, Kang, YK, Koo, DB, Lee, KK. 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. Theriogenology, 59 (1): 33–44.

Hanna, JH, Saha, K, Jaenisch R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. Cell, 143(4):508-25

Hashiyada, Y. 2017. The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. J Reprod Dev, 63(6): 527-538.

Hauschild, J, Petersen, B, Santiago Y, Queisser, AL, Carnwath, JW, Lucas-Hahn, A, Zhang, L, Meng, X, Gregory, PD, Schwinzer, R, Cost, GJ, Niemann, H. 2011. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger 511 nucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 108(29):12013-7.

Hay-Schmidt, A, Viuff, D, Greve, T, Hyttel, P. 2001. Transcriptional activity in *in vivo* developed early cleavage stage bovine embryos. Theriogenology, 56: 167-176.

Hernández Cerón, J y Zarco, L. 1998. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. Ciencia Veterinaria México 8:1-28.

Heyman, Y, Chavatte-Palmer, P, Le Bourhis, D, Campus, S, Vignon, X, Renard, JP. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. Biol Reprod, 66(1):6-13.

Hill, JR, Burghardt, RC, Jones, K, Long, CR, Looney, CR, Shin, T, Spencer, TE, Thompson, JA, Winger, QA, Westhusin, ME. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. Biol Reprod, 63:1787-1794.

Holm, P, Booth, PJ, Schmidt, MH, Greve, T y Callesen, H. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium

supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology, 52(4): 683-700.

Hong, SG, Koo, OJ, Oh, HJ, Park, JE, Kim, M, Kim, GA, Park, EJ, Jang, G, Lee, BC. 2011. Post-mortem re-cloning of a transgenic red fluorescent protein dog. J Vet Sci, 12(4):405-407.

Hoodbhoy, T, Dean, J. 2004. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. Reproduction, 127(4):417-422.

Hoshino, Y, Hayashi, N, Taniguchi, S, Kobayashi, N, Sakai, K, Otani, T, Iritani, A, Saeki, K. 2009. Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80 degrees c freezer for a decade. PLoS One, 4(1):e4142. doi: 10.1371/journal.pone.0004142..

Hu, J, Lei, Y, Wong, WK, Liu, S, Lee, KC, He, X, You, W, Zhou, R, Guo, JT, Chen, X, Peng, X, Sun, H, Huang, H, Zhao, H, Feng, B. (2014). Direct activation of human and mouse Oct4 genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors. Nucleic Acids Res, 42: 4375–4390.

Humblot, P, Le Bourhis, D, Fritz, S, Colleau, JJ, Gonzalez, C, Guyader, Joly, C, Malafosse, A, Heyman, Y, Amigues, Y, Tissier, M, Ponsart, C. 2010. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. Vet Med Int, 2010: 1-8

Hyttel, P, Fair, T, Callesen, H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology, 47:23-32, 1997.

Iager, AE, Ragina, NP, Ross, PJ, Beyhan, Z, Cunniff, K, Rodriguez, RM, Cibelli, JB. 2008. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. Cloning and Stem Cells 2008, 10(3): 371–379.

IETS, International Society of embryo transfer. Data Retrievals 2007-2017. https://www.iets.org/comm\_data.asp

Izadpanah, R, Kaushal, D, Kriedt, C, Tsien, F, Patel, B, Dufour, J, Bunnell, BA. 2008. Long-term *in vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. Cancer Res, 68(11):4229-38

Jedrusik, A, Parfitt, DE, Guo, G, Skamagki, M, Grabarek, JB, Johnson, MH, Robson, P, Zernicka-Goetz, M. 2008. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. Genes Dev, 22(19):2692-706.

Jinek, M, Chylinski, K, Fonfara, I, Hauer, M, Doudna, JA, Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337(6096):816-21.

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

Juillerat, A, Dubois, G, Valton, J, Thomas, S, Stella, S, Maréchal, A, Langevin, S, Benomari, N, Bertonati, C, Silva, GH, Daboussi, F, Epinat, JC, Montoya, G, Duclert, A,

Duchateau, P. 2014. Comprehensive analysis of the specificity of transcription activatorlike effector nucleases. Nucleic Acids Res, 42(8):5390-402.

Kalervo Väänänen, H. 2005. Mesenchymal stem cells. Annals of medicine, Taylor & Francis. 37 (7): 469-479.

Kapur, SK y Katz, AJ. 2013. Review of the adipose derived stem cell secretome. Biochimie, 95(12): 2222–2228.

Katsuda, T, Kosaka, N, Takeshita, F, Ochiya, T. 2013. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. Proteomics, 13:1637–1653

Kearns, NA, Genga, RMJ, Enuameh, MS, Garber, M, Wolfe, SA, Maehr, R. 2014. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. Development, 141: 219–223.

Kern, S, Eichler, H, Stoeve, J, Klüter, H, Bieback, K. 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. Stem Cells, 24:1294-1301.

Khan, DR, Dubé, D, Gall, L, Peynot, N, Ruffini, S, Laffont, L, Le Bourhis, D, Degrelle, S, Jouneau, A, Duranthon, V. 2012. Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. PLoS ONE, 7(3): e34110. doi:10.1371/journal.pone.0034110

Kidder, BL, Palmer, S. 2010. Examination of transcriptional networks reveals an important role for TCFAP2C, SMARCA4, and EOMES in trophoblast stem cell maintenance. Genome Res, 20(4):458-472.

Knobil, E, Nelly, JD. 1994. Fertilization in mammals. Pp: 55-112 en Wassarman, PM, Albertili, DF (eds). The phisiology of reproduction. Ed. Raven Press, New York, USA.

Knott, JG, Paul, S. 2014. Transcriptional regulators of the trophoblast lineage in mammals with hemochorial placentation. Reproduction, 148(6): 121-136.

Kobayashi, T, Yamaguchi, T, Hamanaka, S, Kato-Itoh, M, Yamazaki, Y, Ibata, M, Sato, H, Lee, YS, Usui, J, Knisely, AS, Hirabayashi, M, Nakauchi, H. 201). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. Cell, 142(5): 787-799

Konermann, S, Brigham, MD, Trevino, AE, Joung, J, Abudayyeh, OO, Barcena, C, Hsu, PD, Habib, N, Gootenberg, JS, Nishimasu, H, Nureki, O, Zhang, F. 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. Nature, 517(7536):583-588.

Koo, DB, Kang, YK, Choi, YH, Park, JS, Han, SK, Park, IY, Kim, SU, Lee, KK, Son, DS, Chang, WK, Han, YM. 2000. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. Biol. Reprod. 2000; 63:986-992.

Koo, DB, Kang, YK, Choi, YH, Park, JS, Kim, HN, Oh, KB, Son, DS, Park, H, Lee, KK, Han, YM. 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. Biol Reprod, 67:487-492.

Kouranova, E, Forbes, K, Zhao, G, Warren, J, Bartels, A, Wu, Y, Cui, X. 2016. CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. Hum Gene Ther, 27(6): 464-75.

Kruip, TA, Boni, R, Wurth, YA, Roelofsen, MW, Pieterse, MC. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. Theriogenology, 42(4): 675-84.

Kruip, TA, denDaas, JHG. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. Theriogenology, 47:43–52.

Kuckenberg, P, Buhl, S, Woynecki, T, van Fürden, B, Tolkunova, E, Seiffe, F, Moser, M, Tomilin, A, Winterhager, E, Schorle, H. 2010. The transcription factor TCFAP2C/AP-2gamma cooperates with CDX2 to maintain trophectoderm formation. Mol Cell Biol, 30(13):3310-20.

Kuckenberg, P, Kubaczka, C, Schorle, H. 2012. The role of transcription factor Tcfap2c/TFAP2C in trophectoderm development. Reprod Biomed Online, 25(1):12-20.

Kues, WA y Niemann, H. 2011. Advances in farm animal transgenesis. Prev Vet Med, 102(2):146–156.

Kuijk, EW, Du, Puy, L, Van Tol, HT, Oei, CH, Haagsman, HP, Colenbrander, B, Roelen, BA. 2008. Differences in early lineage segregation between mammals. Developmental Dynamics, 237: 918–927

Kurokawa, M, Fissore, RA. 2003. ICSI-generated mouse zygotes exhibit altered calcium oscillations, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 down-regulation, and embryo development. Mol Hum Reprod, 9(9):523-33.

Kusama, K, Bai, R, Sakurai, T, Bai, H, Ideta, A, Aoyagi, Y, Imakawa, K. 2016. A transcriptional cofactor YAP regulates IFNT expression via transcription factor TEAD in bovine conceptuses. Domest Anim Endocrinol, 57:21-30.

Lee, ST, Gong, SP, Yum, KE, Lee, EJ, Lee, CH, Choi, JH, Kim, DY, Han, H, Kim, KS, Hysolli, E, Ahn, JY, Park, IH, Han, JY, Jeong, JW, Lim, JM. 2013. Transformation of somatic cells into stem cell-like cells under a stromal niche. ASEB J, 27(7):2644-56.

Lee, SH, Kwon, JW, Choi, I, Kim, NH. 2015. Expression and function of transcription factor AP-2c in early embryonic development of porcine parthenotes. Reprod Fertil Dev, 28(8): 1197-1205.

Lesley, J, Hyman, R, Kincade, PW. 2000. Hyaluronan binding by cell surface CD44. J Biol Chem, 275:26967-26975.

Li, L, Wu, LP, Chandrasegaran, S. 1992. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. Proc Natl Acad Sci USA, 89(10):4275-9.

Li, Z, He, X, Chen, L, Shi, J, Zhou, R, Xu, W, Liu, D, Wu, Z. 2013. Bone marrow mesenchymal stem cells are an attractive donor cell type for production of cloned pigs as well as genetically modified cloned pigs by somatic cell nuclear transfer. Cell Reprogram, 15(5):459–470.

Liechty, KW, MacKenzie, TC, Shaaban, AF, Radu, A, Moseley, AM, Deans, R, Marshak, DR, Flake, AW. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. Nat Med, 6(11):1282-1286.

Lim, JM, Gong, SP. 2013. Somatic cell transformation into stem cell-like cells induced by different microenvironments. Organogenesis, 9(4): 245–248.

Lin, S, Ewen-Campen, B, Ni, X, Housden, BE, Perrimon, N. 2015. *In vivo* transcriptional activation using CRISPR-Cas9 in drosophila. Genetics, 201: 433–442.

Locatelli P, Olea FD, Hnatiuk, A, De Lorenzi, A, Cerdá, M, Giménez, CS, Sepúlveda, D, Laguens, R, Crottogini, A. 2015. Mesenchymal stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor in ovine myocardial infarction. Gene Ther, 22(6):449-57.

Loh, YH, Wu, Q, Chew, JL, Vega, VB, Zhang, W, Chen, X, Bourque, G, George, J, Leong, B, Liu, J, Wong, KY, Sung, KW, Lee, CW, Zhao, XD, Chiu, KP, Lipovich, L, Kuznetsov, VA, Robson, P, Stanton, LW, Wei, CL, Ruan, Y, Lim, B, Ng, HH. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet, (4):431-40.

Loi, P, Toschi, P, Zacchini, F, Ptak, G, Scapolo, PA, Capra, E, Stella, A, Marsan, PA, Williams, JL. 2016. Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. Genet Sel Evol, 48(1):53.

Lonergan, P, Monaghan, P, Rizos, D, Boland, MP, Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. Mol Reprod Dev, 37(1):48-53.

Maeder, ML, Linder, SJ, Cascio, VM, Fu, Y, Ho, QH, Joung, JK. 2013. CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes. Nat Methods, 10(10): 977-979

Magnani, L, Cabot, RA. 2009. Manipulation of SMARCA2 and SMARCA4 transcript levels in porcine embryos differentially alters development and expression of SMARCA1, SOX2, NANOG, and EIF1. Reproduction, 137(1): 23–33.

Mali, P, Yang, L, Esvelt, KM, Aach, J, Guell, M, DiCarlo, JE, Norville, JE, Church, GM. 2013a. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339(6121):823–826

Mali, P, Aach, J, Stranges, PB, Esvelt, KM, Moosburner, M, Kosuri, S, Yang, L, Church, GM. 2013b. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nat Biotechnol, 31(9): 833–838

Martin, GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 78: 7634–7638.

Masui, S, Nakatake, Y, Toyooka, Y, Shimosato, D, Yagi, R, Takahashi, K, Okochi, H, Okuda, A, Matoba, R, Sharov, AA, Ko, MS, Niwa, H. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nat Cell Biol, 9(6):625-35.

Matoba, S, Inoue, K, Kohda, T, Sugimoto, M, Mizutani, E, Ogonuki, N, Nakamura, T, Abe, K, Nakano, T, Ishino, F, Ogura, A. 2011. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. Proc Natl Acad Sci USA, 108(51):20621-20626.

Matoba, S, Liu, Y, Lu, F, Iwabuchi, KA, Shen, L, Inoue, A, Zhang, Y. 2014. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. Cell, 159(4):884-95.

McGrath, J, Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos. J Exp Zool, 228: 355–362.

Memili, E, First, NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. Zygote, 8(1):87-96.

Miller, JC, Tan, S, Qiao, G, Barlow, KA, Wang, J, Xia, DF, Meng, X, Paschon, DE, Leung, E, Hinkley, SJ, Dulay, GP, Hua, KL, Ankoudinova, I, Cost, GJ, Urnov, FD, Zhang, HS, Holmes, MC, Zhang, L, Gregory, PD, Rebar, EJ. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat. Biotechnol. 29(2):143-148.

Mintz, B. 1962 a. Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of the zona pellucida. Science, 138: 594.

Mintz, B. 1962 b. Experimental recombination of cells in in the developing mouse egg: normal and lethal mutant genotypes. Am. Zool. 2: 541-542

Miranda, MS, Nascimento, HS, Costa, MP, Costa, NN, Brito, KN, Lopes, CT, Santos, SS, Cordeiro, MS, Ohashi, OM. 2016. Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. J Assist Reprod Genet, 33(10): 1395–1403.

Misica-Turner, PM, Oback, FC, Eichenlaub, M, Wells, DN, Oback, B. 2007. Aggregating embryonic but not somatic nuclear transfer embryos increases cloning efficiency in cattle. Biol Reprod, 76: 268–278.

Mitchell, JB, McIntosh, K, Zvonic, S, Garrett, S, Floyd, ZE, Kloster, A, Di Halvorsen, Y, Storms, RW, Goh, B, Kilroy, G, Wu, X, Gimble, JM. 2006. Immunophenotype of human adiposederived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. Stem Cells. 24(2): 376-385.

Mojica, FJ, Díez-Villaseñor, C, García-Martínez, J, Soria, E. 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. J Mol Evol, 60: 174–182.

Moore, SG y Hasler, JF. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. J Dairy Sci, 100(12):10314-10331.

Moro, LN, Jarazo, J, Sestelo, A, Salamone, D. 2012. Generation of interspecific cloned blastocysts by zona pellucida-free nuclear transfer in wild felids. Reprod Fertil Dev, 25: 167–167

Moro, LN, Hiriart, MI, Buemo, C, Jarazo, J, Sestelo, A, Veraguas, D, Rodriguez-Alvarez, L, Salamone, DF. 2015. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene expression. Reproduction, 150(1): 1-10.

.Moustafa, L y Hahn, J. 1978. Experimentelle Erzeugung von identischen Mtlusezwillingen. Dtsch. Tiertlrztl. Wochenschr, 242-244.

Nagy, A, Rossant, J, Nagy, R, Abramow-Newerly, W, Roder, JC. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage ESCs. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 8424–8428

Niemann, H, Kues, WA, Lucas-Hahn, A, Carnwath, JW. 2013. Somatic Cloning and Epigenetic Reprogramming in Mammals. Pp 101–124. En: Atala A, Lanza R, Thomson JA, and Nerem R (2eds.). Principles of Regenerative Medicine, Elsevier, ISBN: 978-0123814227, 2011:129-158.

Niemann, H. 2016. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNTbased cloning. Theriogenology, 86(1):80-90.

Nishiyama, A, Xin, L, Sharov, AA, Thomas, M, Mowrer, G, Meyers, E, Piao, Y, Mehta, S, Yee, S, Nakatake, Y, Stagg, C, Sharova, L, Correa-Cerro, LS, Bassey, U, Hoang, H, Kim, E, Tapnio, R, Qian, Y, Dudekula, D, Zalzman, M, Li, M, Falco, G, Yang, HT, Lee, SL, Monti, M, Stanghellini, I, Islam, MN, Nagaraja, R, Goldberg, I, Wang, W, Longo, DL, Schlessinger, D, Ko, MS. 2009. Uncovering early response of gene regulatory networks in ESCs by systematic induction of transcription factors. Cell Stem Cell, 5(4):420-33.

Nowak-Imialek, M, Niemann, H. 2012. Pluripotent cells in farm animals: state of the art and future perspectives. Reprod Fertil Dev, 25(1):103-28.

Oback, B, Wiersema, AT, Gaynor, P, Laible, G, Tucker, FC, Oliver, JE, Miller, AL, Troskie, HE, Wilson, KL, Forsyth, JT, Berg, MC, Cockrem, K, McMillan, V, Tervit, HR, Wells, DN. 2003. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. Cloning Stem Cells, 5(1):3-12.

Oback, B. 2009. Cloning from stem cells: different lineages, different species, same story. Reprod Fertil Dev, 21: 83–94.

Odorico, JS, Kaufman, D, Thomson, J. 2001. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. Stem Cells, 19: 193-204.

Ogura, A, Inoue, K, Wakayama, T. 2013. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. Phil Trans R Soc B, 368(1609): 20110329–20110329

Oh, HJ, Park, JE, Kim, MJ, Hong, SG, Ra, JC, Jo, JY, Kang, SK, Jang, G, Lee, BC. 2011. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. Theriogenology, 75(7):1221-1231.

Oikawa, M, Matoba, S, Inoue, K, Kamimura, S, Hirose, M, Ogonuki, N, Shiura, H, Sugimoto, M, Abe, K, Ishino, F, Ogura, A. 2013. RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. J Reprod Dev. 59(3):231-7.

Olivera, R, Moro, LN, Jordan, R, Luzzani, C, Miriuka, S, Radrizzani, M, Donadeu, FX, Vichera, G. 2016. *In vitro* and *In vivo* Development of Horse Cloned Embryos Generated with iPSCs, Mesenchymal Stromal Cells and Fetal or Adult Fibroblasts as Nuclear Donors.PLoS One, 11(10):e0164049. doi: 10.1371/journal.pone.0164049.

Olivera, R, Moro, LN, Jordan, R, Pallarols, N, Guglielminetti, A, Luzzani, C, Miriuka, SG, Vichera, G. 2018. Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. Stem Cells Cloning, 11: 13–22

Onishi, A, Iwamoto, M, Akita, T, Mikawa, S, Takeda, K, Awata, T, Hanada, H, Perry, AC. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science, 289(5482): 1188-90.

Ono, Y, Kono, T. 2006. Irreversible barrier to the reprogramming of donor cells in cloning with mouse embryos and embryonic stem cells. Biol Reprod, 75(2):210-6.

Ozawa, M, Sakatani, M, Yao, J, Shanker, S, Yu, F, Yamashita, R, Wakabayashi, S, Nakai, K, Dobbs, KB, Sudano, MJ, Farmerie, WG, Hansen, PJ. 2012. Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. BMC Dev Biol, 12(1):33.

Ozil, JP, Heyman, Y, Renard, JP. 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. Vet. Rec. J:126-127 (1982).

Papi, M, Brunelli, R, Familiari, G, Frassanito, MC, Lamberti, L, Maulucci, G, Monaci, M, Pappalettere, C, Parasassi T, Relucenti M, Sylla, L, Ursini, F, De Spirito, M. 2012. Whole-change in bovine zona pellucid biomechanics after fertilization: how relevant inhindering polyspermy? PLoSOne; 7(9):e45696. doi: 10.1371/journal.pone.0045696.

Park, KW, Lai, L, Cheong, HT, Cabot, R, Sun, QY, Wu, G, Rucker, EB, Durtschi, D, Bonk, A, Samuel, M, Rieke A, Día, BN, Murphy, CN, Carter, DB, Prather, RS. 2002. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. Biol Reprod, 66:1001–1005.

Parrish, JJ. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. Theriogenology, 81(1):67-73.

Pedersen, HG, Schmidt, M, Sangild, PT, Strobech, L, Vajta, G, Callesen, H, Greve, T. 2005. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. Mol Cell Endocrinol, 234:137–143.

Pereyra-Bonnet, F, Fernández-Martín, R, Olivera, R, Jarazo, J, Vichera, G, Gibbons, A, Salamone, D. 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. Reprod Fertil Dev, 20(7):741-9.

Perez-Pinera, P, Kocak, DD, Vockley, CM, Adler, AF, Kabadi, AM, Polstein, LR, Thakore, PI, Glass, KA, Ousterout, DG, Leong, KW, Guilak, F, Crawford, GE, Reddy,

TE, Gersbach, CA. 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors. Nat Methods, 10(10): 973-976.

Petite, H, Viateau, V, Bensaid, W, Meunier, A, de Pollak, C, Bourguignon, M, Oudina, K, Sedel, L, Guillemin, G. 2000. Tissue-engineered bone regeneration. Nature Biotech, 18(9): 959-963

Picou, AA. 2009. The isolation and characterization of bovine adult derived adipose stem cells for the use in nuclear transfer. LSU Master's Theses. 3541.

Pieterse, MC, Vos, PL, Kruip, TA, Wurth, YA, van Beneden, TH, Willemse, AH, Taverne, MA. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology, 35(4):857-862.

Poehland, R, Al-Rostum, F, Becker, F, Viergutz, T, Brunner, RM, Kanitz, W, Bhojwani, S. 2007. Donor cell lines considerably affect the outcome of somatic nuclear transfer in the case of bovines. J Reprod Dev, 53:737–748

Polejaeva, IA, Chen, SH, Vaught, TD, Page, RL, Mullins, J, Ball, S, Dai, Y, Boone, J, Walker, S, Ayares, DL, Colman, A, Campbell, KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature, 407(6800):86-90.

Prather, RS, Hageman, L, First, NL. 1989. Preimplantation aggregation and injection chimeras. Gamete Res, 22:233-247.

Prather, RS. 2013. Pig genomics for biomedicine. Nat Biotechnol, 31(2):122-124

Proudfoot, C, Carlson, DF, Huddart, R, Long, CR, Pryor, JH, King, TJ, Lillico, SG, Mileham, AJ, McLaren, DG, Whitelaw, CB, Fahrenkrug, SC. 2015. Genome edited sheep and cattle. Transgenic Res, 24(1):147-53.

Real Academia Española. 2001. Diccionario de la lengua española, 22a edición - Consultado en http://www.rae.es/rae.html

Reik, W, Dean, W, Walter, J. 2001. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. Science, 293: 1089-1093

Ren, Y, Wu, H, Zhou, X, Wen, J, Jin, M, Cang, M, Guo, X, Wang, Q, Liu, D, Ma, Y. 2012. Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells. Res Vet Sci, 93(1):404-11.

Reshak, AH, Shahimin, MM, Buang, F. 2013. Comparative study on human and bovine AT-SC isolation methods. Prog Biophys Mol Biol, 113(2):295-8.

Ribeiro, Ede S, Gerger, RP, Ohlweiler, LU, Ortigari, I Jr, Mezzalira, JC, Forell, F, Bertolini, LR, Rodrigues, JL, Ambrosio, CE, Miglino, MA, Mezzalira, A, Bertolini M. 2009. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. Cloning Stem Cells, 11:377–386.

Rodriguez-Martinez, H. 2012. Assisted Reproductive Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations. Reprod Dom Anim, 47 (1): 21–26

Rodríguez-Pardo, VM. 2005. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. Universitas Scientiarum, 10 (1): 5-14

Rogers, AN, Welte, S, Black, SJ, Baldwin, CL. 2002. Partial cDNA sequences of bovine CD72 and CD166/ALCAM, ligands for SRCR-family accessory molecules CD5 and CD6. Vet Immunol Immunopathol, 85(3-4): 233-239.

Rossant, J, Frels, WI. 1980. Interspecific chimeras in mammals: successful live chimeras between Mus musculus and Mus caroli. Science, 208: 419-421.

Rossant, J. 2004. Lineage development and polar asymmetries in the periimplantation mouse blastocyst. Semin Cell Dev Biol, 15: 573–581.

Rutenberg, MS, Hamazaki, T, Singh, AM, Terada, N. 2004. Stem cell plasticity, beyond alchemy. Int J Hematol, 79:15-21.

Salamone, DF, Adams, GP, Mapletoft, RJ. 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. Theriogenology, 52 (4): 549-61

Salamone, D, Barañao, L, Santos, C, Bussmann, L, Artuso, J, Werning, C, Prync, A, Carbonetto, C, Dabsys, S, Munar, C, Salaberry, R, Berra, G, Berra, I, Fernández, N, Papouchado, M, Foti, M, Judewicz, N, Mujica, I, Muñoz, L, Alvarez, SF, González, E, Zimmermann, J, Criscuolo, M, Melo, C. 2006. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. J Biotechnol. 124(2):469-72.

Salamone, DF, Canel, NG, Rodríguez, MB. 2017. Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. Reproduction, 154(6):111-124.

Santiago, Y, Chan, E, Liu, PQ, Orlando, S, Zhang, L, Urnov, FD, Holmes, MC, Guschin, D, Waite, A, Miller, JC, Rebar, EJ, Gregory, PD, Klug, A, Collingwood, TN. 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 105(15):5809–14.

Sawyer, HR, Smith, P, Heath, DA, Juengel, JL, Wakefield, StJ, McNatty, KP. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. Biol Reprod, 66 (4):1134-1150.

Seidel, GE Jr. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. Science, 211(4480):351-8.

Seruggia, D, Montoliu, L. 2014. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. Transgenic Res, 23(5):707-16.

Shamblott, MJ, Axelman, J, Wang, S, Bugg, EM, Littlefield, JW, Donovan, PJ, Blumenthal, PD, Huggins, GR, Gearhart, JD. 1998. Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Primordial Germ Cells. PNAS, 95: 13726-13731.

Shen, B, Zhang, W, Zhang, J, Zhou, J, Wang, J, Chen, L, Wang, L, Hodgkins, A, Iyer, V, Huang, X, Skarnes, WC. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. Nat Methods, 11(4): 399-402.

Smith, LC, Suzuki, J Jr, Goff, AK, Filion, F, Therrien, J, Murphy, BD, Kohan-Ghadr, HR, Lefebvre, R, Brisville, AC, Buczinski, S, Fecteau, G, Perecin, F, Meirelles, FV. 2012. Developmental and Epigenetic Anomalies in Cloned Cattle. Reprod Domest Anim, 47 (4): 107–114.

Soto, DA, Ross, PJ. 2016. Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering. Transgenic Res, 25:289–306.

Takahashi, K, Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126(4):663-676.

Tanenbaum, ME, Gilbert, LA, Qi, LS, Weissman, JS, Vale, RD. 2014. A proteintagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. Cell, 159(3):635-646.

Tarkowski, AK. 1961. Mouse chimaeras developed from fused eggs. Nature, 190:857–860.

Thomson, JA, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, SS, Waknitz, MA, Swiergiel, JJ, Marshall, VS. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282:1145–1147

Tian, C, Ambroz, RJ, Sun, L, Wang, Y, Ma, K, Chen, Q, Zhu, B, Zheng, JC. 2012. Direct conversion of dermal fibroblasts into neural progenitor cells by a novel cocktail of defined factors. Curr Mol Med, 12(2): 126-37.

Tu, Z, Yang, W, Yan, S, Yin, A, Gao, J, Liu, X, Zheng, Y, Zheng, J, Li, Z, Yang, S, Li, S, Guo, X, Li, XJ. 2017. Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos. Sci Rep, 7: 42081.

Uccelli, A, Moretta, L, Pistoia, V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol, 8(9):726-36. Review.

Umbaugh, RE. 1951. Superovulation and ovum transfer in cattle. Fertil Steril, 2(3):243-52.

Vajta, G, Peura, TT, Holm, P, Páldi, A, Greve, T, Trounson, AO, Callesen, H. 2000. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. Mol Reprod Dev, 55(3):256-64.

Vajta, G. 2007. Somatic cell nuclear transfer in its first and second decades: successes, setbacks, paradoxes and perspectives. Reprod. Biomed, 15:582–590.

Van der Oost, J. 2013. Molecular biology. New tool for genome surgery. Science, 339:768-70.

Vejlsted, M, Avery, B, Schmidt, M, Greve, T, Alexopoulos, N, Maddox-Hyttel, P. 2005. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. Biol Reprod, 72: 678–686.

Verma, OP, Kumar, R, Kumar, A, Chand, S. 2012. Assisted Reproductive Techniques in Farm Animal - From Artificial Insemination to Nanobiotechnology. Vet. World, 5(5): 301-310

Vidal, MA, Kilroy, GE, Lopez, MJ, Johnson, JR, Moore, RM, Gimble, JM. 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Vet Surg, 36 (7):613-622.

Villar, J, Munar, C, Salamone, D, Caamaño, N, Laport, EO, Burry, E, Vautier, R, Sadir, A, Singh, E, Acree, J, Carrillo, B. 1991. Transferencia de embriones bovinos libres del virus de la fiebre aftosa. Rev. Med. Vet. 71: 268-276

Vora, S, Tuttle, M, Cheng, J, Church, G. 2016. Next stop for the CRISPR revolution: RNA-guided epigenetic regulators. FEBS J, 283(17):3181-3193.

Wagers, AJ, Weissman, IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. Cell, 116(5):639-48. Review

Wagner, W, Wein, F, Seckinger, A, Frankhauser, M, Wirkner, U, Krause, U, Blake, J, Schwager, C, Eckstein, V, Ansorge, W, Ho, AD. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol, 33: 1402-1416.

Wakayama, T, Rodriguez, I, Perry, AC, Yanagimachi, R, Mombaerts, P. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 14984–14989.

Wang, H, Yang, H, Shivalila, CS, Dawlaty, MM, Cheng, AW, Zhang, F, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Casmediated genome engineering. Cell, 153: 910–918.

Webster, RA, Blaber, SP, Herbert, BR, Wilkins, MR, Vesey G. 2012. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. N Z Vet J, 60(5):265-72.

Wei, S, Zou, Q, Lai, S, Zhang, Q, Li, L, Yan, Q, Zhou, X, Zhong, H, Lai, L. 2016. Conversion of embryonic stem cells into extraembryonic lineages by CRISPR-mediated activators. Sci Rep, 6:19648

Wells, KD, Powell, AM. 2000. Blastomeres from somatic cell nuclear transfer embryos are not allocated randomly in chimeric blastocysts. Cloning, 2(1):9-22.

White, MD, Angiolini, JF, Alvarez, YD, Kaur, G, Zhao, ZW, Mocskos, E, Bruno, L, Bissiere, S, Levi, V, Plachta, N. 2016. Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. Cell. 24, 165(1):75-87.

White, MD, Zenker, J, Bissiere, S, Plachta, N. 2017. How cells change shape and position in the early mammalian embryo. Curr Opin Cell Biol, 44:7-13.

Wicklow, E, Blij, S, Frum, T, Hirate, Y, Lang, RA, Sasaki, H, Ralston, A. 2014. HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst.PLoS Genet, 10(10):e1004618. doi: 10.1371/journal.pgen.1004618.

Willadsen, SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 320, 63-65.

Williams, CJ. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. Hum Reprod Update, 8(4):313-21.

Williams, KJ, Picou, AA, Kish, SL, Giraldo, AM, Godke, RA, Bondioli, KR. 2008. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. Cells Tissues Organs. 188:251-258.

Wilmut, I, Schnieke, A, McWhir, J, Kind, A, Campbell, K. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385(6619):810-813.

Wilmut, I, Beaujean, N, de Sousa, PA, Dinnyes, A, King, TJ, Paterson, LA, Wells, DN, Young, LE. 2002. Somatic cell nuclear transfer. Nature, 419(6907), 583–586.

Wolf, E, Braun-Reichhart, C, Streckel, E, Renner, S. 2014. Genetically engineered pig models for diabetes research. Transgenic Res, 23(1):27–38

Wrenzycki, C, Lucas-Hahn, A, Herrmann, D, Lemme, E, Korsawe, K, Niemann, H. 2002. *In vitro* Production and Nuclear Transfer Affect Dosage Compensation of the X-Linked Gene Transcripts G6PD, PGK, and Xist in Preimplantation Bovine Embryos. Biol Reprod, 66: 127–134

Wrenzycki, C, Herrmann, D, Lucas-Hahn, A, Korsawe, K, Lemme, E, Niemann, H. 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. Reprod Fertil Dev, 17(1-2):23-35

Yamanaka, K, Sakatani, M, Kubota, K, Balboula, AZ, Sawai, K, Takahashi, M. 2011. Effects of downregulating DNA methyltransferase 1 transcript by RNA interference on DNA methylation status of the satellite I region and *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. J Reprod Dev, 57(3):393-402.

Yang, D, Yang, H, Li, W, Zhao, B, Ouyang, Z, Liu, Z, Zhao, Y, Fan, N, Song, J, Tian, J, Li, F, Zhang, J, Chang, L, Pei, D, Chen, YE, Lai, L. 2011. Generation of PPARc mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. Cell Res, 21(6):979–82.

Yang, MY, Fortune, JE. 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during midgestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. Biol Reprod, 78:1153–1161.

Young, HE, Mancini, ML, Wright, JC, Black, AC Jr, Reagan, CR, Lucas, PA. 1995. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. Dev Dyn, 202:137–144.

Young, LE, Sinclair, KD, Wilmut, I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. Rev Reprod, 3: 155–163.

Young, RA. 2011. Control of the Embryonic Stem Cell State. Cell, 144: 940-954.

Yu, S, Luo, J, Song, Z, Ding, F, Dai, Y, Li, N. 2011. Highly efficient modification of beta518 lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. Cell Res, 21(11):1638–40.

Zhang, F, Cong, L, Lodato, S, Kosuri, S, Church, GM, Arlotta, P. 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nature Biotechnology, 29(2): 149–153.

Zhang, S, Chen, X, Wang, F, An, X, Tang, B, Zhang, X, Sun, L, Li, Z. 2016. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. Sci Rep, 6:30345

Zhenhua G, Rajput SK, Folger JK, Di L, Knott JG, Smith GW. 2017. Pre- and Peri-/Post-Compaction Follistatin Treatment Increases *In vitro* Production of Cattle Embryos. PLoS One, 12(1):e0170808.

Zhou, LQ, Dean J. 2015. Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. Trends Cell Biol, 25(2): 82-91.

Zhou, W, Xiang, T, Walker, S, Abruzzese, RV, Hwang, E, Farrar, V, Findeisen, B, Sadeghieh, S, Arenivas, F, Chen, SH, Polejaeva, I. 2008. Aggregation of bovine cloned embryos at the four-cell stage stimulated gene expression and *in vitro* embryo development. Mol Reprod Dev, 75:1281–1289.

Zuk, PA, Zhu, M, Mizuno, H, Huang, J, Futrell, JW, Katz, AJ, Benhaim, P, Lorenz, HP, Hedrick, MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng, 7(2):211-28.

Zuk, PA, Zhu, M, Ashjian, P, De Ugarte, DA, Huang, JI, Mizuno, H, Alfonso, ZC, Fraser, JK, Benhaim, P, Hedrick, MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell, 13(12):4279-4295.