

# **Patrón de Expresión de IGF2, IGF2R, DNMT1, DNMT3A y OCT-4 en embriones bovinos *Bos Indicus* producidos *in vitro* e *in vivo* y su relación con desordenes de Imprinting genómico**

Estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Julian Montoya López  
Esteban Ceballos Cadavid  
David Vélez  
Sara Lucia Arroyave

Director

Rodrigo Urrego Alvarez PhD

Codirector

Natalia Chavarría

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad CES  
Medellín, Colombia  
2015

## Resumen

El uso de tecnologías de reproducción asistida (TRA) se ha convertido en una herramienta importante para el incremento de la producción bovina, las técnicas más utilizadas hasta el momento son la producción de embriones *in vitro* (PIV) e *in vivo*. Sin embargo se evidencia diferencias entre la calidad y viabilidad de los embriones obtenidos con cada de ellas; dichas diferencias e inclusive la incidencia de diferentes anomalías y síndromes se han atribuido a posibles alteraciones de la reprogramación epigenética de los embriones. La epigenética enmarca su estudio en efectos del medio sobre la expresión de genes con relación a imprinting genómico lo cual tienen gran incidencia en procesos de embriogénesis temprana como por ejemplo control de la diferenciación celular, regulación génica, inactivación del cromosoma X e impronta genómica.

Los estudios sobre las posibles alteraciones de la reprogramación epigenética y de los fenómenos asociados son muy prometedores para comprender por qué los embriones PIV son diferentes a los obtenidos *in vivo*, igualmente, para comprender los mecanismos básicos de anomalías del desarrollo como el síndrome del ternero grande asociado a embriones PIV y a algunos síndromes observados en humanos que aumentan su incidencia cuando hay utilización de alguna de las TRA. Por ende, el objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de expresión de los genes implicados en el proceso de imprinting genómico IGF2 y su receptor asociado IGF2R, DNMT1, DNMT3A y un indicador de diferenciación celular OCT4 (POU5F1) por PCR cuantitativa en embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro* en estado de blastocisto. No se evidencia diferencia significativa en la abundancia relativa de DNMT3A, IGF2R y POU5F1 entre blastocistos *in vivo* vs *in vitro*, si embargo, los resultados evidencian cantidad significativamente mas baja de DNMT1 e IGF2 ( $p > 0,05$ ) en embriones *in vitro* comparado con los producidos *in vivo*.

**Palabras clave:** Bovino, epigenética, Genes improntados, embriones in vitro, IGF2, IGF2-R, OCT-4 (POU5F1), DNMT3A, DNMT1

## Abstract

The use of assisted reproductive technologies (ART) has become an important tool for increasing beef production, the techniques used so far are *in vitro* embryos production (IVP) and *in vivo*. However differences between the quality and viability of embryos obtained in both techniques are evident; differences and even the incidence of various abnormalities and syndromes have been attributed to possible changes in the epigenetic reprogramming of embryos. Epigenetic involves studies in environmental effects on gene expression related to genomic imprinting which have important implications for early embryogenesis processes such as control of cell differentiation, gene regulation, X chromosome inactivation, and genomic imprinting. Studies on possible impairment of epigenetic reprogramming and associated phenomena are very promising for understanding why PIV embryos are different from those obtained *in vivo*, also, to understand the basic mechanisms of developmental abnormalities as large offspring syndrome in cattle IVP embryos and associated syndromes observed in some human increasing its incidence when using any of the TRA. Therefore, the objective of this study was evaluate the expression levels of genes involved in the process of genomic imprinting IGF2 receptor and its associated IGF2R, DNMT1, DNMT3A and an indicator of cell differentiation OCT4 (POU5F1) by quantitative PCR in embryos produced bovine *in vivo* and *in vitro* blastocyst stage. There is not significant difference between relative abundance of DNMT3A, IGF2R and POU5F1 blastocysts *in vivo* vs *in vitro*, however, the results *in vitro* embryos show significantly lower amount of DNMT1 and IGF2 ( $p > 0.05$ ) than produced *in vivo*.

**Keywords:** Bovine, epigenetic, imprinted genes, *in vitro* embryos, IGF2, IGF2-R, OCT-4 (POU5F1), DNMT3A, DNMT1



# 1. Formulación del problema

## 1.1 Planteamiento del problema

La ganadería en Colombia en los últimos años ha tenido un crecimiento significativo en el sector pecuario (Mahecha, Gallego, & Peláez, 2002), incursionando en el uso de biotecnologías reproductivas altamente difundidas en Latinoamérica en la última década, sobre todo en Brasil y Argentina. Es así, como la inseminación artificial y la producción de embriones *in vitro* e *in vivo*, han sido biotecnologías en crecimiento en Colombia, satisfaciendo un mercado nuevo en la ganadería, donde las exigencias y la presión productiva del sector han hecho que se incursione en el uso de herramientas que tecnifiquen la producción ganadera.

En Colombia la actividad ganadera tiene una participación del 1.7% en el PIB nacional y un 53% del PIB pecuario, lo que hace la principal actividad pecuaria del país con un aporte 2.5 veces mayor que el sector avícola y 4.9 veces el sector porcícola (1), sin embargo, esta actividad se desarrolla de forma extensiva ocupando actualmente alrededor de 39.000 millones de hectáreas del territorio nacional cultivadas con pastos y rastrojos para sostener 25.000.000 de cabezas, cuando se estima que el uso potencial para la ganadería es de 19.000 hectáreas, esto está generando sobre-utilización del suelo para esta actividad y le resta territorio a otras actividades económicas importantes como la agricultura (1).

Para el año 2012 la producción total del leche fue de 6.390 millones de litros y el sacrificio fue de 4.163 millones de cabezas (19), estas cifras están contempladas para ser mejoradas en el plan estratégico de la Ganadería Colombiana entre las metas principales fijadas para el año 2019, con este plan se espera que el hato ganadero aumente a 30.000.000 de cabezas, que el sacrificio aumente a 6.490.000 cabezas y se produzcan 9.045 millones de litros de leche al año, esto utilizando sólo 28 millones de hectáreas para abastecer a 50 millones de habitantes que se estima habrán en dicho año (1,19) (tabla 2).

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos es una de estas biotecnologías reproductivas que ha mostrado ser una herramienta útil con una relación costo-beneficio positiva y que se viene aplicando de una forma comercial por varias compañías en diferentes países del mundo (3,21). La PIVE es una biotecnología reproductiva utilizada como herramienta en el mejoramiento genético bovino, posee aplicabilidad comercial y científica porque acelera los procesos de mejoramiento genético y permite estudiar los fenómenos moleculares y bioquímicos ocurridos durante la maduración del ovocito, la capacitación espermática, la interacción de gametos y el desarrollo embrionario temprano. Básicamente, la PIVE comprende tres pasos: 1) La maduración *in-vitro* de los ovocitos (MIV) obtenidos de ovarios por medio de aspiración folicular, 2) La fertilización *in-vitro* (FIV) de los ovocitos madurados y 3) El cultivo *in-vitro* de embriones hasta un estado transferible.

Existen diferencias entre los embriones producido *in vitro* e *in vivo*, en cuanto a su competencia para el desarrollo y su criotolerancia, las cuales no son mas que respuesta a la expresion diferencial de genes. (Urrego, Rodriguez-Osorio, & Niemann, 2014)

Los organismos diploides poseen dos copias de cada gen autosómico, cada copia proviene de uno de los progenitores. Muchos genes autosómicos son expresados simultáneamente a partir de ambos alelos; sin embargo, en un pequeño grupo de genes uno de los alelos es silenciado de manera específica en un proceso llamado impronta. La impronta genómica es un proceso mediante el cual se

introduce modificaciones químicas a nucleótidos, basado sobre su origen parental, lo que conlleva a que uno de los alelos del gen sea funcional y el otro alelo este silenciado (Manipalviratn, DeCherney, & Segars, 2009). El significado de la impronta genómica fue mostrado inicialmente en estudios de transferencia nuclear en ratones (McGrath J, 1984) (Surani, Barton, & Norris, 1984). De estos estudios, se observó que embriones de ratón generados a partir de dos pronúcleos femeninos (ginogonones biparentales) o dos pronúcleos masculinos (androgonones biparentales) no sobrevivían más allá de la mitad de la gestación. Los androgonones presentaron un bajo desarrollo en el tejido embrionario pero un muy buen desarrollo en el tejido extraembrionario, mientras que los ginogonones aparecen con un bajo desarrollo en los tejidos extraembrionarios y un desarrollo normal del embrión (Barton, Surani, & Norris, Role of paternal and maternal genomes in mouse development. , 1984) (Barton, Adams, Norris, & Surani, 1985) De estos estudios, se concluyó que los genomas materno y paterno no son equivalentes en su contribución a la embriogénesis normal.

En el genoma de los mamíferos, hay aproximadamente más de 200 genes improntados (Luedi, Dietrich, Weidman, Bosko, Jirtle, & Hartemink, 2007) de los cuales, más de 70 se han encontrado en el ratón y por lo menos 50 genes improntados en humanos han sido reportados en la literatura hasta el momento (<http://www.har.mrc.ac.uk/research/developmental-genetics-section/genomic-imprinting>, <http://igc.otago.ac.nz>). En muchos genes, el estado de impronta es conservado entre ratones y humanos (Reik, et al., 2003) y en algunos genes se ha reportado que el estado de impronta se conserva e inclusive en otras especies, por ejemplo en bovinos (Arnold, Lefebvre, & Smith) (Curchoe, et al., 2005). La función de los genes improntados está generalmente asociada al adecuado desarrollo y función de la placenta, así como del crecimiento fetal (Wagschal, et al., 2008).

El correcto establecimiento y mantenimiento de la impronta genómica durante la embriogénesis es necesario para el adecuado desarrollo embrionario y placentario (40). Epimutaciones que afectan la impronta pueden surgir durante la

desmetilación del ADN, que puede ocurrir durante la embriogénesis temprana, o en la migración de las células germinales a la gónada en estados prenatales, durante el establecimiento de la impronta o su mantenimiento a través de la vida del organismo (41,42). Un claro ejemplo de disturbios epigenéticos en el desarrollo es la interferencia causada por tecnologías de reproducción asistida. Estas técnicas comúnmente interfieren con el establecimiento de la impronta (manipulación de gametos) o el mantenimiento de la impronta por la manipulación de embriones preimplantatorios (41).

El IGF2 fue uno de los primeros genes improntados descubiertos (43). IGF2 y su receptor IGF2R, son esenciales durante el desarrollo fetal y placentario (44). Mientras la copia materna del gen IGF2 se encuentra improntado en humanos y ratones, la expresión del gen IGF2R se da a partir de la copia materna y recientes estudios han demostrado que IGF2R no está improntado en humanos (45,46), la relación entre ambos genes es un conflicto biológico por definir (47,48).

El gen IGF2 se encuentra en un clúster de genes improntados donde también se localiza el gen H19, el cual codifica para un ARN no traducido (27). Una región corriente arriba del gen H19 regula la expresión de los genes improntados IGF2-H19 (49). El establecimiento y mantenimiento de la metilación del ADN en una región DMR ubicada entre ambos genes es adquirida durante la espermatogénesis en las células germinales del macho; sin embargo, la DMR de las células germinales de la hembra es protegida de la metilación por una proteína aisladora CTFC que utiliza dedos de Zinc para unirse al ADN (50). Debido a la protección ejercida por CTFC, en el alelo materno se previene la interacción entre el gen IGF2 y el enhancer localizado corriente arriba del gen H19, bloqueando la transcripción del gen IGF2. En el alelo paterno, como CTFC no se une a la DMR, el gen IGF2 es expresado y el ADN es metilado en el promotor del gen H19, lo que genera un silenciamiento del gen. El diferente estado de metilación de los locus IGF2-H19 permite garantizar la expresión

exclusiva del gen IGF2 desde la copia paterna y del gen H19 desde la copia materna (51).

La importancia del origen parental de los genes IGF2/H19 fue claramente demostrada cuando Konno y colaboradores 2004 (52) produjeron de manera exitosa nacimiento de ratones partenogénicos a través de unas correctas dosis de los genes IGF2/H19. En este experimento, uno de los alelos maternos fue obtenido de oocitos que no estaban en fase de crecimiento (ng), mientras que el otro alelo se obtuvo a partir de oocitos que había culminado la fase crecimiento (fg). El proceso de impronta en la línea germinal materna ocurre en los estadios finales de la ovogénesis. Por consiguiente, los oocitos ng se considera que poseen una impronta neutral y ambos genes IGF2/H19 son expresados. Debido a la introducción de una delección del gen H19 y sus regiones flanqueantes en oocitos ng y consecuentemente la alteración de la impronta del gen IGF2, los autores demostraron que el desarrollo de oocitos partenogénicos puede llegar a termino final controlando la expresión de los genes IGF2/H19, además de otros genes que permiten la sobrevivencia del partogononte.

El silenciamiento de los elementos genéticos puede ser exitosamente iniciado y mantenido por la modificación de las proteínas histonas y la estructura de la cromatina. Sin embargo, estas modificaciones son fácilmente reversibles por lo cual no es muy efectivo para mantener el silenciamiento en el largo plazo (53-55). Por lo tanto, las células de los mamíferos deben poseer un mecanismo adicional para prolongar el silenciamiento. Un importante componente de este proceso es la metilación del ADN. La metilación del ADN es una típica marca epigenética(56-58), en la cual hay una adaptación estructural de una región cromosómica sin que ocurra un cambio en la secuencia de nucleótidos(15). Está modificación puede regular la actividad genómica y puede ser mantenida a través de los procesos de mitosis y meiosis(58).

Las islas de citosina-fosfato-guanina (CpG) son regiones del genoma que contienen una alta frecuencia de dinucleótidos CG. Las islas de CpG están cerca o dentro de las regiones promotoras y en el caso de los humanos, se presentan en aproximadamente el 70% de los genes(59). La metilación del ADN generalmente ocurre sobre los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG por la acción de varias ADN metiltransferasas (DNMT) (15).

En células normales, los tres principales blancos que son reprimidos por la metilación del ADN son: primero, genes improntados parentalmente, por ejemplo, genes que son expresados diferencialmente a partir del cromosoma materno o paterno. Esta regulación es clave durante el desarrollo embrionario y la vida adulta (50). En la mayoría de los casos el alelo inactivo es marcado por metilación en el ADN y la expresión monoalelica es perdida en la ausencia de metilación (60). Segundo, los transposones y otras secuencias repetidas que constituyen una fracción en el genoma de los mamíferos (61). Y tercero, Un número de genes son metilados de manera tejido-especifico (62). Un interesante subconjunto de estos genes son los antígenos cáncer/testis (C/T), los cuales no están metilados y se expresan en la testis, pero se encuentra metilado y silenciado en todos los otros tejidos(63).

Por más de 20 años, la metilación del ADN ha sido correlacionada con la inhibición de la transcripción. Han sido propuestos numerosos mecanismos que explican como la metilación puede afectar la transcripción. Un modelo sugiere que la metilación del ADN puede impedir directamente la unión de los factores de transcripción a sus sitios blancos, lo cual bloque el proceso transcripcional. Otros mecanismos propuestos están basados sobre la idea de que la metilación de las secuencias CpG puede alterar la estructura de la cromatina afectando la

modificación de las histonas llevando a que regiones promotoras de genes queden dentro del nucleosoma (55).

La modulación de la metilación durante la embriogénesis es un proceso que es altamente regulado y dinámico a lo largo de todo el desarrollo. Durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, el genoma padece una amplia desmetilación excepto en la metilación que marca los genes improntados (20,64). Unas horas después de la fertilización y antes de la primera replicación del ADN, el genoma paterno es desmetilado considerablemente, mientras que el genoma materno es desmetilado después de varias divisiones celulares (65). Esta desmetilación es seguida por una metilación *de novo*, la cual establece un nuevo patrón de metilación embrionario. El ADN de los blastocistos posee relativamente una baja metilación. La función biológica de este dinámico proceso de reprogramación de la metilación del ADN en el desarrollo temprano, no está completamente dilucidada. Varios estudios soportan la hipótesis de que la metilación del ADN es crucial para el establecimiento de la expresión génica durante el desarrollo embrionario (66,67). Sin embargo, datos recientes sugieren que la metilación del ADN quizá solo afecta genes que son silenciados por otros mecanismos en el embrión, indicado que la metilación del ADN podría ser una consecuencia más que una causa del silenciamiento de genes durante el desarrollo temprano (61,68,69).

Las metiltransferasas del ADN son un requerimiento esencial durante el desarrollo embrionario, lo cual es confirmado en experimentos donde los genes de las Dnmt son alterados a formas no funcionales. Con excepción de la Dnmt2, todos los knockouts muestran severos defectos en el desarrollo (64). Embriones homocigóticos para una mutación que anula completamente al gen Dnmt1 no sobreviven más allá de la mitad de la gestación y muestran severas anomalías en el desarrollo (70). La inactivación de Dnmt1 conlleva a un

genoma ampliamente desmetilado, con niveles residuales de metilación detectables en células madre embrionarias (70).

Ratones knockout para Dnmt2 son viables y fértiles (71) e igualmente, cuando se altera el gen Dnmt2 en células madres embrionarias estas conservan una apariencia normal sin defectos en la metilación *de novo* o de mantenimiento (72). Dnmt2 a diferencia de Dnmt1, Dnmt3a, y Dnmt3b que poseen un dominio regulatorio en la región N-terminal, Dnmt2 carece de dicho dominio pero comparte los motivos requeridos para la actividad metiltransferasa. Paradójicamente, Dnmt2 es evolutivamente la más conservada de la familia de las Dnmt, con estrecha relación con enzimas encontradas en varias especies de plantas, hongos, metazoos y protozoos (73).

Las diferentes Dnmt, son altamente conservadas a nivel estructural y funcional, no solo dentro de los mamíferos sino en todos los eucariotes, destacando la importancia del patrón de metilación y la regulación de la expresión génica, particularmente durante la gametogénesis y la embriogénesis. El entendimiento de las complejas interacciones entre estas enzimas y su papel durante el desarrollo pueden dar una luz sobre el rol de la epigenética en la reproducción humana y en las enfermedades (74).

## **1.2 Justificación de la propuesta**

En los países desarrollados, 1-3% de los nacimientos involucra alguna forma de tecnología de reproducción asistida (ART). Se ha sugerido que hay una relación entre niños concebidos por inyección espermática intracitoplasmática y el síndrome de Angelman (AS) (75), ha habido una preocupación que conduce a

que los desordenes de impronta genómica quizá sean más prevalentes en niños nacidos después de alguna ART. El soporte biológico para dicha hipótesis está fundado en que en el modelo de ratón y en los medios de cultivo embrionario de diferentes especies se afecta negativamente la impronta genómica(76-78). Los datos de muchas publicaciones realizadas en Europa, Norteamérica y Australia sugieren que hay una asociación entre el síndrome Becwith-Wiedemann (BWS), AS y el retinoblastoma con las ARTs(15).

Las ARTs involucran la manipulación de muchos pasos de la concepción, la estimulación de producción de gametos hasta el cultivo *in vitro* de embriones. Estas manipulaciones incluyen: el uso de hormonas corriente abajo para regular la función de la pituitaria y estimular una producción supernumeraria de oocitos, la maduración *in vitro* de oocitos, el uso de espermatozoides inmaduros, el uso de la ICSI, el cultivo *in vitro* de embriones preimplantatorios, la transferencia del embrión al útero y la criopreservación de gametos y embriones. Algunos de estos pasos de las ARTs quizá alteren el proceso de impronta normal(15).

Aunque el efecto de las ARTs sobre la impronta genómica en humanos no ha sido muy estudiado debido a las consideraciones éticas, hay varios modelos animales que sugieren que las ARTs quizá afecten el proceso de impronta(15). Es bien conocido en bovinos el síndrome de ternero grande (LOS), el cual se produce cuando los embriones bovinos son cultivados *in vitro*, generando en algunas ocasiones terneros que nacen con un elevado peso, dificultad respiratoria neonatal, sobre crecimiento de órganos, anomalías en el sistema óseo y un aumento en la incidencia de muerte repentina neonatal(7). El LOS ha sido asociado con una reducción en la metilación fetal y expresión del *IGF2R*, lo cual puede ser causado por un cultivo *in vitro* de embriones suplementado con suero bovino fetal(79).

El gen *IGF2R* es expresado a partir de la copia materna y contiene dos DMRs que muestran diferencias en el origen parental de metilación: la DMR1 (ubicada

dentro de la región promotora) esta metilada en el alelo paterno, el cual no se expresa; mientras que DMR2 (localizada dentro del intrón 2) posee un patrón de metilación específico en el alelo materno, el cual es expresado (80). Teniendo en cuenta, que *IGF2R* actúa como receptor del *IGF2*, el balance en la expresión de los genes es importante para regular los efectos del *IGF2*. Patrones aberrantes de metilación en la región DMR2 y alteraciones en la expresión del gen *IGF2R* están relacionados con muerte neonatal (81), con LOS (79) y con alteraciones en el desarrollo de la placenta en bovinos (5).

Por el lado de los humanos, hubo tres series de casos reportados en el 2003 de BWS registrados en Europa y los Estados Unidos que sugirió una asociación entre BWS y las ARTs (82-84). En el 2003 De Baun y colaboradores reportaron siete casos de BWS en niños nacidos después del uso de alguna ART (dos por fertilización *in vitro* y cinco por ICSI) (82). El BWS es un raro desorden de impronta con una incidencia estimada de 1 en 13.700 nacimientos vivos(85), es un síndrome de sobre crecimiento congénito caracterizado por macroglosia, defectos en la línea media de la pared abdominal, macrosomía, hipoglicemia neonatal (86). BWS es un desorden multigénico, causado por fallas en la regulación de genes ubicados en el cromosoma 11p15 involucrados en la regulación del ciclo celular y crecimiento celular (87).

El síndrome de Angelman es un raro desorden neurogenético caracterizado por un severo retardo mental, convulsiones y paso anormal (88). La causa molecular del AS es una deficiencia en la expresión de la copia materna del gen *UBE3A*, localizado en un clúster de genes improntados en el cromosoma 15q11 a 15q13 en el cerebro (88,89). La prevalencia del AS ha sido estimada en 1:12.000 en la población general(90). Sin embargo, cuando la causa de la enfermedad es un defecto en la impronta, la prevalencia es de aproximadamente 1:300.000(75). Los estudios muestran que hay siete casos reportados de niños nacidos con AS después de una FIV o un ICSI, cinco de estos niños poseen defectos de impronta

como factor causante de la enfermedad(75,91,92). Aunque, el número de casos es muy pequeño, propio de una enfermedad poco común, la proporción de niños con defectos de impronta como causa del AS es del 71% (30-32), bastante alta en comparación con la población general, sugiriendo una asociación entre el AS y las ARTs.

## Objetivos

1. Evaluar la expresión de las DNMT1 y DNMT3A en embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro*.
2. Evaluar la expresión de los genes improntados IGF2 e IGF2R en embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro*.

## Materiales y Métodos

### 1.1 Tipo de Estudio

Se realiza un estudio experimental de carácter analítico en donde se evalúa el nivel de expresión de los genes DNMT1, DNMT3A, IGF2, IGF2R y OCT-4 (POUF5) por PCR cuantitativa en embriones producidos *in vivo* e *in vitro*. Para tal efecto, se tuvieron los siguientes grupos de estudio:

Grupo I: 52 Embriones en estado de blastocisto producidos *in vivo* mediante un protocolo convencional de superovulación, inseminación artificial y lavado de embriones al día 7 pos inseminación. Los embriones fueron sometidos a análisis molecular para evaluar expresión de genes.

Grupo II: 800 Embriones en estado de blastocistos al día 7 producidos *in vitro*. Los embriones fueron sometidos a análisis molecular para evaluar niveles de expresión de los genes de estudio.

### *Población y diseño muestral*

Los embriones que harán parte de la población objeto de estudio de los grupos definidos anteriormente son seleccionados mediante un muestreo no probalístico por conveniencia; en donde, bajo criterios previamente establecidos por Li *et al* (Li, et al., 2009)) se realiza la selección de oocitos que serán la materia prima para la producción de los embriones que entran a hacer parte del estudio.

### *Descripción de las variables a evaluar*

Para el estudio tiene dos variables independientes, embriones producidos *in vivo* y embriones producidos *in vitro*, sobre las cuales se evalúa el efecto sobre la siguiente variable:

Abundancia relativa de ARNm de los genes seleccionados: variable dependiente, cuantitativa, su escala de medición y medida de codificación es de 0-1.

## **1.2 Obtención de Muestras**

### *Producción in vitro de embriones*

Para la producción *in vitro* de embriones, se utilizará la metodología descrita por Blondin *et al* 2002 (Blondin, Bousquet, Twagiramungu, Barnes, & Sirard, 2002). Los ovarios bovinos *Bos indicus* (Brahman) se obtuvieron de hembras sacrificadas en la central de beneficio Envicarnicos, ubicada en el municipio de Envigado, Antioquia. Los ovarios se

depositaron en solución salina estéril a 35°C para luego ser transportados (15-20 minutos aproximadamente) hasta el Laboratorio de Biotecnología en Salud de la Universidad CES ubicado en el municipio de Sabaneta, Antioquia. Una vez en el laboratorio, con jeringa de 5 ml provista de aguja N° 18G, se procedió a la aspiración de los folículos que poseían un diámetro entre 4 y 8 milímetros y su contenido fue recolectado en un tubo estéril de plástico de 50ml colocado en baño maría a 30°C. El aspirado se dejó decantar por un periodo de 15 minutos y luego bajo estereomicroscopio se procedió a la selección de los complejos cúmulos-ocitos (CCO's) manipulados en medio TALP-HEPES suplementado con 0,4% de BSA (Sigma Chemical, ST Louis, EE.UU).

Los complejos cúmulos-ovocito se clasificaron morfológicamente según el aspecto del citoplasma y la morfología de las capas de células cumulus (Khurana & Niemann, 2000) (Li, et al., 2009), tomando de las siguientes categorías sólo las tipo 1 y 2:

Grado	Denominación	Características
1	Excelente	Con cuatro o más capas de células del cúmulo. Citoplasma homogéneo y transparente.
2	Bueno	Con capas múltiples de células de cúmulo (entre una y tres) Citoplasma Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3	Regular	Desnudados, citoplasma irregular con zonas oscuras
4	Malo	Células expandidas, irregular con zonas oscuras

**Tabla 1. Categorías de clasificación morfológica de Complejos cúmulos Oocitos bovinos.**

### *Maduración in-vitro*

Una vez obtenidos los CCO's se lavarán tres veces en medio de TL-Hepes suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (SFB), 0.2 mM de ácido pirúvico y 50 g/ml de sulfato de gentamicina. Para el proceso de maduración se colocarán 10 CCO's en gotas de 50 l de medio de maduración (Nutricell Nutrientes Celulares, Brasil) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS Gibco 25030081, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) previamente equilibrado por un periodo mínimo de dos horas en incubadora de CO<sub>2</sub>, y se cubren las gotas con aceite mineral (Sigma Química, St Louis, EE.UU.). La maduración se realiza por un período de 24 horas a una temperatura de 38.5°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 90%.

### *Fertilización in-vitro*

Para la fertilización *in vitro* se utilizó semen criopreservado de un toro Brahman con fertilidad comprobada, cuyas pajuelas fueron descogeladas en baño maría a 37°C y se realizó proceso de lavado capacitación para la obtención de espermazoides móviles (Blondin, Bousquet, Twagiramungu, Barnes, & Sirard, 2002) mediante centrifugación a 700 x g durante 10 min en un gradiente de densidad discontinua (45-90%) de Percoll (Sigma Chemical, St Louis, EE.UU.).

La fertilización *in vitro* se realizó en un medio FIV (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, Brasil) suplementado con penicilamina, hipotaurina, la epinefrina y heparina (10 I/ml). Los espermatozoides se añadieron para llegar a una concentración final de  $2 \times 10^6$  /ml y se co-incubaron con aproximadamente 10 COC`s madurados *in vitro* durante 18-21 horas a una temperatura de 38.5°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 90%.

### *Cultivo in-vitro de los presuntos cigotos*

Después de la fertilización, los presuntos cigotos fueron desnudados parcialmente mediante pipeteo mecánico y lavados tres veces en medio TALP-Hepes suplementado con 0.3% (W/V) de BSA (libre de ácidos grasos) y 0.2 mM de ácido pirúvico. Grupos de 15-20 cigotos fueron cultivados en gotas de 50 I de medio SOFaa (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, Brasil), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS Gibco 25030081, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) cubiertas con aceite mineral y preincubadas por un tiempo mínimo de 2 horas bajo las condiciones de cultivo.

El cultivo de embriones se realizó a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> y una humedad relativa del 90%. Tras 72 horas post-inseminación (hpi), se realizó recambio del 50% del volumen de la gota cultivo por medio fresco SOFaa (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, Brasil), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS Gibco 25030081, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.), y se realizó evaluación de las tasas de clivaje y descarte de células no fecundadas. Pasadas 162 hpi (D7), se

evalúa la tasa de producción de embriones, los blastocistos grado 1 o 2 (Gordon, 2003) fueron almacenado en grupos de 5 unidades en 70 l de reactivo Trizol® (Invitrogen), congelados y almacenados a -80 ° C para análisis moleculares.

### *Obtención Embriones in vivo*

Los procedimientos para la producción *in vivo* de embriones fueron llevados a cabo en el Instituto de Cuidado Animal de la Universidad de Antioquia. De un hato comercial de brahman (*Bos indicus*) en Antioquia (Colombia) se realizó la selección de las donadoras para la producción in vivo de embriones de acuerdo a su estado sanitario y reproductivo. Se examinó órganos reproductivos mediante palpación transrectal y ecografía (Aloka SSD 500, transductor lineal de 5 MHz, Aloka, Inc., Tokio, Japón). Fueron seleccionadas 5 hembras adultas con ciclicidad hormonal, no preñadas con una condición corporal de  $3 \pm 0,5$  unidades (escala de uno a cinco, donde uno indica demacrada/subcondicionamiento y cinco obesos/sobrecondicionamiento) (Correa-Orozco & Uribe-Velásquez, 2010)

Las vacas fueron sincronizadas y superestimuladas de acuerdo con el siguiente protocolo:

Día	Hora	Actividad
0	a.m.	- Dispositivo intravaginal de 1 g de progesterona (DIB, Syntex SA, Buenos Aires, Argentina)
		- Inyección de 2,0 mg benzoato de estradiol im (Ric-Be, Syntex SA);
4	a.m.	250 UI de FSH (Pluset, Calier, España)
	p.m.	250 UI de FSH Pluset, Calier, España)
5	a.m.	250 UI de FSH (Pluset, Calier, España)
	p.m.	250 UI de FSH (Pluset, Calier, España)
6	a.m.	- 250 UI de FSH (Pluset, Calier, España) - 0,150 mg cloprostenol im (Prolise®, Tecnopec, Sao Paulo, Brasil)
	p.m.	- 250 UI de FSH (Pluset, Calier, España) - Retiro de dispositivo transvaginal DIB

- 24 Patrón de Expresión de IGF2, IGF2R, DNMT1, DNMT3A y OCT-4 en embriones bovinos *Bos indicus* producidos *in vitro* e *in vivo* y su relación con desordenes de Imprinting genómico.

---

7	a.m.	250 UI de FSH (Pluset, Calier, España)
	p.m.	250 UI de FSH (Pluset, Calier, España)
8	p.m.	Inseminación Artificial
9	a.m.	Inseminación Artificial
15		COLECTA DE EMBRIONES

---

**Tabla 2. Protocolo de Superovulación de hembras bovinas para la obtención de embriones in vivo**

El día D15 se embriones se colectaron los embriones de forma no quirúrgica utilizando la técnica descrita por Neto et al, 2005. (Neto a, Sanches, Binelli, Seneda, Perri, & Garcia, 2005). Los embriones recuperados fueron evaluados de acuerdo a la etapa de desarrollo y calidad. Los blastocistos de grado 1 o 2 se recuperaron y se almacena a -80°C en grupos de 5 embriones en 70 l de reactivo Trizol® (Invitrogen) como se describe antes de embriones producidos *in vitro*.

## 1.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

### *Extracción de RNA*

Tres grupos (5 blastocisto/grupo) de embriones bovinos producidos *in vitro* e *in vivo*, fueron procesados para extracción de RNA total usando protocolo de reactivo Trizol® (invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. (Chomczynski & Sacchi, 2006) (Rio, Ares, Hannon, & Nilsen, 2010)

### *Diseño de primers*

Los primers para detección de la abundancia de transcritos de los genes analizados DNMT1 (Referencia de secuencia NCBI NM\_182651.2), DNMT3A (Referencia de secuencia NCBI NM\_001206502), IGF2 (Referencia de secuencia NCBI NM\_174087.3), IGF2R (Referencia de secuencia NCBI NM\_174352.2) y OCT-4 en los embriones bovinos y el gen normalizador GADPH (Referencia de secuencia NCBI NM\_001034034) se diseñaron usando el software Primer 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA). Se comparó en BLAST la secuencia de ARNm para determinar posibles homologías con otras regiones del genoma. Los primers se diseñaron de tal manera que

ambos se encuentran en exones diferentes, lo que permitió evaluar posible contaminación genómica. Se evitaron regiones con repeticiones de nucleótidos o dinucleótidos. Se evaluó la estabilidad de los primers en el extremo 3qy se evaluó la posibilidad de formación de estructuras secundarias como dímeros y ganchos. Se eligieron primers que no forman productos secundarios y cuya temperatura de disociación está entre 58° y 60°C. Los primers diseñados se presentan en la siguiente tabla (Tabla 3):

Nombre del Gen	Símbolo del Gen	Función	Primer sequence (5'-3')	Fragment size (pb)
<b>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1</b>	<i>DNMT1</i>		F: AGTGGGGGACTGTGTTTCTG R: TGCTGTGGATGTACGAGAGC	218
<b>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha</b>	<i>DNMT3A</i>		F: GGGGTCTTCATTCCCAATTT R: AAAACCTGCAGCCTTTGGAGA	266
<b>Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)</b>	<i>IGF2</i>		F: AATCAGAGCCCAAATTGACG R: GTGTGTTCTCGTCCTTGGT	167
<b>Insulin-like growth factor 2 receptor</b>	<i>IGF2R</i>		F: GTCGTGCAGATCAGTCCTCA R: GTCGTTCTGGAGCTGAAAGG	153
<b>POU class 5 homeobox 1</b>	<i>OCT-4</i>	NM_174580.2	F: AGTGAGAGGCAACCTGAAGA R: ACACTCGGACCACGTCTTTC	110
<b>Glyceraldehyde-3-phosphate deshidrogenase*</b>	<i>GAPDH</i>		F: TGCTGGTGCTGAGTATGTGGT R: AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	295

**Tabla 3. Secuencia de Primers usada para el análisis de expresión de genes en PCR en tiempo real.**

La eficiencia de los primers se midió mediante PCR convencional usando cDNA para determinar el número de ciclos y la temperatura. Los productos se corrieron en geles de agarosa al 2%.

### *Transcripción reversa RT-PCR y obtención del cDNA*

La transcripción reversa se realizó usando el kit SuperScript<sup>III</sup> Platinum<sup>®</sup> Two-Step qRT-PCR Kit-100PCR de Invitrogen (Cat# 11734-050). Este kit combina la eficiencia en la síntesis de la transcriptasa reversa SuperScript<sup>III</sup> con la especificidad del arranque en caliente (hot-star) de la taq polimerasa Platinum<sup>®</sup>. Se realizó según las instrucciones del fabricante. Los parámetros utilizados para la transcripción reversa fueron 25 °C for 10 min, 42 °C for 50 min y 85 °C for 5 min. El cDNA obtenido se almacenó a -80°C hasta ser evaluado posteriormente en PCR cuantitativa en tiempo real.

### *PCR cuantitativa en tiempo real - qPCR*

Las reacciones se hicieron con QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Cat no. 204143) y se corrió en un termociclador Rotor-Gene<sup>i</sup> 6000 (Corbett Life Science). Se midió la abundancia de transcriptos de los genes OCT-4 y MATER en ovocitos inmaduros y del gen FST en células de la granulosa. La concentración de los primers se ajustó a 10 µM. Los parámetros del termociclador se programaron así: 15 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, 15 segundos a 95°C para desnaturalización, 30 segundos a 60°C para la hibridación de los primers, 30 segundos a 72°C para amplificación y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para el gen FST se corrieron 35 ciclos, para el gen MATER 40 ciclos y para OCT-4 55 ciclos. Se determinó la curva de disociación comenzando a 55°C con incrementos de 0.5°C por 10 segundos en el ciclo final.

## **1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS**

Para la ejecución de estos experimentos se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos.

La expresión relativa se analizó con la *herramienta de software de expresión relativa* (REST). El modelo matemático usado por REST se basa en las correcciones para la eficiencia exacta de la PCR y la desviación entre las muestras y el control. Se utilizó el

gen de referencia GAPDH (número de acceso en el GenBank Z86039). La eficiencia de la PCR se calculó utilizando el software LingRegPCR. Las mediciones se hicieron con 3 repeticiones biológicas y 3 repeticiones técnicas y se toma un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .



# Resultados

## 1.5 Producción de Embriones in Vitro

Se realiza producción de embriones a partir de oocitos de hembras faenadas, obteniendo los siguientes resultados:

Grupos	COCs (Replicas)	Tasa de clivaje (Cliv /Cigotos)	Tasa	Tasa	Tasa
			Blastocistos d7 sobre presuntos cigotos (D7/Cigotos)	Blastocistos d7 sobre oocitos clivados (D7/cliva)	Blastocistos eclosionados (Eclo/D7)
Repetición 1	300	82,9 (214/258)	31,8 (82/258)	38,3 (82/214)	90,5 (38/42)
Repetición 2	300	80,9 (220/272)	31,6 (86/272)	39,1 (86/220)	72,0 (36/50)
Repetición 3	200	75,4 (126/167)	31,6 (53/167)	42,1 (53/126)	82,6 (19/23)

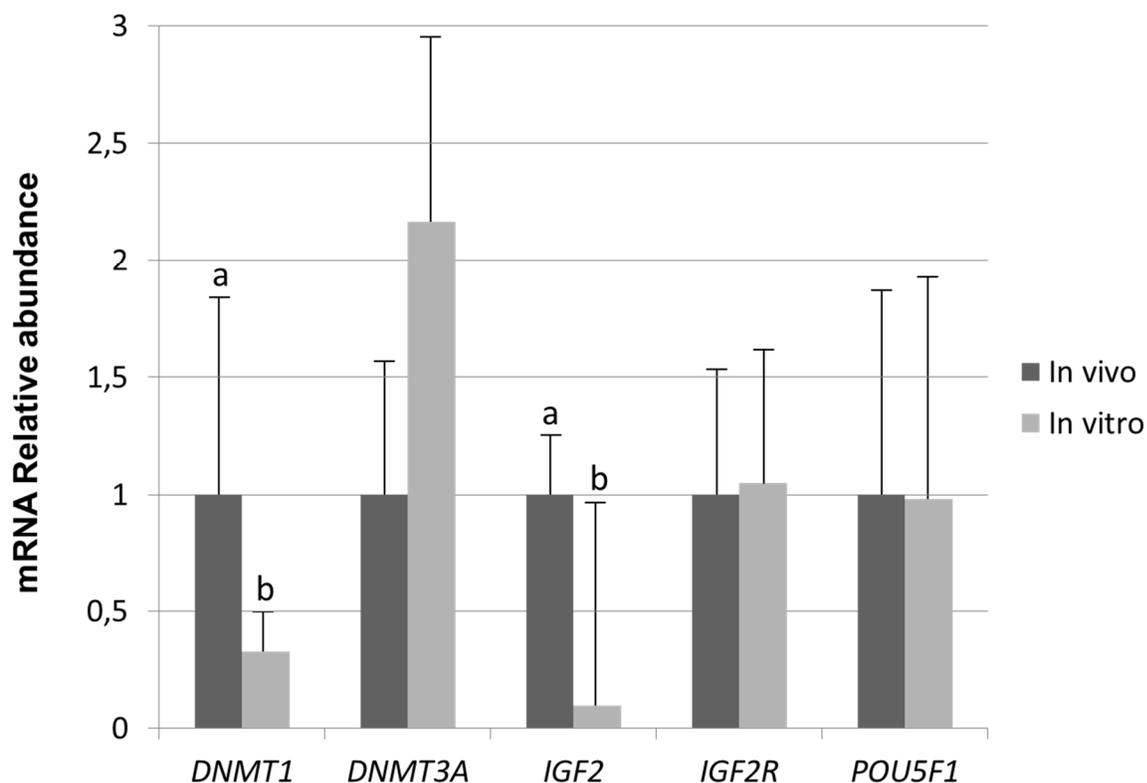
Tabla 4. Resultados de producción in vitro de embriones. Laboratorio de biotecnología Universidad CES, grupo de investigación ReproCes-INCACES-Centauro

## 1.6 Expresión de Genes

*Análisis de expresión de los genes DNMT1, DNMT3A, IGF2, IGF2R y OCT-4 en blastocistos producidos in vitro e in vivo.*

Para determinar la influencia de la producción de embriones *in vitro* sobre la expresión de genes implicados en la reprogramación epigenética en embriones bovinos tempranos, se realizó el análisis RT- qPCR en blastocistos bovinos producidos *in vitro* y patrones de expresión génica en comparación con la de blastocistos producidos *in vivo* . La expresión de GAPDH se utilizó como referencia.

En comparación con los embriones *in vivo*, los niveles de transcripción de DNMT1 y IGF2 se redujeron en los embriones producidos *in vitro* (  $P < 0,05$  ), mientras que los niveles de transcritos de DNMT3A, IGF2R y OCT-4 no fueron significativamente diferentes entre los blastocistos producidos *in vivo* vs *in vitro* (Fig 1) .



Imágen 1. Nivel de Transcritos (media +SEM) de los genes DNMT1, DNMT3A, IGF2, IGF2R y OCT4 (POU5F1) que fueron analizados por RT-qPCR en embriones *Bos Indicus* producidos *in vivo* (Columna oscura) e *in vitro* (columna Clara). Cada grupo fue analizado usando tres grupos de diferentes replicas biológicas con tres repeticiones técnicas. <sup>a,b</sup> Letras en las barras indican valores diferentes ( $P > 0,05$ )

## Discusión

La producción *in vitro* de embriones es un herramienta muy utilizada para multiplicar genotipos mejorados y corresponde a alternativa a la transferencia convencional de embriones que viene siendo usada en muchos países. En sur América, desde el 2004 la mayoría de los embriones bovinos han sido producidos por PIV, especialmente en animales *Bos Indicus* (Camargo, Freitas, de Sa, de Moraes Ferreira, Serapiao, & Viana, 2010). Sin embargo estudios de desarrollo temprano en mamíferos sugieren alteraciones en la expresión de genes y metilación errónea del ADN que son consecuencias de la exposición de los embriones al cultivo *in vitro* (Urrego, Rodriguez-Osorio, & Niemann, 2014) (Niemann, et al., 2010) (Wrenzycki, Lucas-Hahn, Herrmann, Lemme, Korsawe, & Niemann, 2002). En el presente estudio, se investigó la influencia de los sistemas de producción de embriones sobre los niveles de expresión de mRNA de genes importantes en la epigenética del desarrollo temprano cuantificados en embriones *Bos Indicus* producidos *in vitro* vs *in vivo*.

El control epigenético de la expresión génica es un aspecto importante del desarrollo embrionario temprano (Dobbs, Rodriguez, Sudano, Ortega, & Hansen, 2013). El desarrollo de embriones bovinos sometidos a cultivo *in vitro* se asocia a una mayor frecuencia de anomalías en los fetos y neonatos, estas anormalidades se cree que son en cierta medida resultado de fallas en el control epigenético (Urrego, Rodriguez-Osorio, & Niemann, 2014) (Wrenzycki, Herrmann, Lucas-Hahn, Korsawe, Lemme, & Niemann, 2005) (Rodriguez-Osorio, Urrego, Cibelli, Eilertsen, & Memili, 2012). Se encuentra un patrón de expresión alterado de los genes DNMT1 e IGF2 en blastocistos bovinos producidos *in vitro* vs *in vivo*,

mientras que no hubo diferencias significativas para los genes DNMT3A , IGF2R y POU5f1 .

La metilación del ADN genómico, catalizada por las DNA metiltransferasas (DNMTs), es un importante mecanismo de regulación epigenética de genes durante la gametogénesis y principios de la embriogénesis (Smith & Meissner, 2013). La primera metiltransferasa de ADN identificada, DNMT1, desempeña un papel clave en el mantenimiento de la metilación del ADN mediante la restauración del patrón de metilación en las hebras de ADN hemi-metilado recién sintetizadas durante la replicación (Bestor, Gundersen, Kolsto, & Prydz, 1992) (Pradhan, Bacolla, Wells, & Roberts, 1999). Como se muestra en la imagen 1, la expresión de DNMT1 fue reducida de manera significativa estadísticamente en blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Estudios previos han indicado fallas en el patrón de expresión del gen DNMT1, por ejemplo, en humanos hay una baja expresión del gen DNMT1 en embriones de mala calidad en comparación con los embriones del grupo control del estudio (Petruzza, Van de Velde, & De Rycke, 2014). Los niveles de transcripción de DNMT1 en embriones bovinos obtenidos por transferencia nuclear de célula somática (SCNT) fueron menores sugiriendo que la programación epigenética por DNMT1 es esencial para el desarrollo preimplantatorio bovino (Golding, Williamson, Stroud, Westhusin, & Long, 2011). Asimismo, se ha demostrado que la vitrificación disminuyó la abundancia de ARNm de DNMT1 en oocitos de ratón, probablemente como un efecto de la alteración en las marcas epigenéticas (Zhao, Ren, Du, Hao, Wang, & Qin, 2013).

La DNMT3A es una proteína que ha sido identificada como una ADN metiltransferasa *de-novo* que actúa con igual eficiencia durante el desarrollo embrionario temprano sobre el ADN hemi-metilado y no metilado (Okano, Bell, Haber, & Li, 1999). Pese a las diferencias en los niveles de expresión de la DNMT1, en las condiciones del presente estudio, los niveles de transcripción de DNMT3A no fueron afectados por el cultivo *in vitro*. Estos resultados difieren de los resultados reportados por Hoffmann et al. (2006), en el que la expresión de DNMT3A se vió afectada por cultivo *in vitro* (Hoffmann, Niemann, Hadel, Herrmann, & Wrenzycki, 2006), así como la cantidad y la localización de la proteína en las blastómeras bovina (Drallmeyer S, 2009) .

En la presente investigación se realizó medición de la abundancia de ARNm del factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) uno de los primeros genes improntados en ser descubiertos (DeChiara, Robertson, & Efstratiadis, 1991), de igual manera que la abundancia de ARNm de su receptor el IGF2R, ambos transcritos esenciales durante el desarrollo fetal de la placenta (Constância, Hemberger, Hughes, Dean, Ferguson-Smith, & Fundele, 2002). Durante la investigación, la abundancia relativa de IGF2 fue menor en los embriones producidos *in vitro* que en los producidos *in vivo*, tal vez, este efecto es debido a la suplementación con suero bovino fetal en el medio de cultivo; es frecuente el uso de bajas concentraciones de dicho suero en el medio de cultivo en PIV comercial de embriones bovinos ya que su adición ha demostrado tener consecuencias graves con efectos significativos con respecto a la integridad

epigenética del embrión temprano, generando alteraciones en la expresión y la metilación de varios genes improntados como el IGF2 (Velker BAM, 2012). Se ha reportado que los niveles de IGF2 fueron significativamente mayores en blastocistos morfológicamente excelentes y de buena calidad en comparación con blastocistos de baja calidad (Valleh, Hyttel, Rasmussen, & Strøbech, 2014). Además, es bien sabido que la calidad de los embriones expuestos a cultivo *in vitro* es menor en comparación con los obtenidos a partir de desarrollo *in vivo* (Niemann, et al., 2010). El presente estudio confirma que el IGF2 podría ser utilizado como un biomarcador que revela información valiosa para la selección de embriones con un mayor potencial de implantación o para la evaluación y optimización de medios de cultivo.

A diferencia de los perfiles de expresión de gen IGF2, la abundancia de transcriptos para IGF2R no difirió en embriones PIV en comparación con los del grupo de control. Sin embargo, otros estudios han revelado que la pérdida de expresión IGF2R en bovinos, se traduce en un crecimiento excesivo del feto y de la placenta de la receptora después de la transferencia de los embriones bien sea producidos o manipulados *in vitro* (Farin, Alexander, & Farin, 2010) (Farin, Piedrahita, & Farin, 2006) (Farmer, Farin, Piedrahita, Bischoff, & Farin, 2013). La expresión errada de IGF2R se correlaciona directamente con Síndrome de ternero gigante o Síndrome de Large Offspring (LOS) en ovejas [ (Young, et al., 2001).

---

Del mismo modo, este estudio no encontró diferencias en el nivel de expresión de POU5F1 (antes llamado OCT4). Aunque los niveles de transcripción de POU5F1 pueden ser alterados significativamente por las condiciones de cultivo *in vitro*, Purpera y compañeros, demostraron que POU5F1 tiene un nivel de transcripción significativamente mayor en blastocistos cultivados en medio KSOMaa en comparación con los blastocistos cultivados en SOFaa y en embriones producidos *in vivo* (Purpera, Giraldo, Ballard, Hylan, Godke, & Bondioli, 2009). POU5F1 es un miembro de la familia del factor de transcripción POU con un perfil de expresión específico de la línea germinal; ha sido ampliamente utilizado para identificar células pluripotentes en muchas especies diferentes, además de que es crítico para el desarrollo de preimplantación bovina (Kirchhof, Carnwath, Lemme, Anastassiadis, Schöler, & Niemann, 2000), (Herrmann, Dahl, Lucas-Hahn, Collas, & Niemann, 2013).



# Conclusiones y recomendaciones

## 1.7 Conclusiones

Los resultados evidencian diferencias moleculares entre los embriones bovinos *in vitro* vs *in vivo*, los niveles de transcritos de dos (DNMT1 e IGF2) de los genes analizados fueron alterados de manera significativa por la condiciones de cultivo *in vitro*. Estos resultados concuerdan con otros resultados reportados sobre la respuesta de embriones bovinos a las alteraciones en su medio ambiente con modificaciones de los niveles de expresión de algunos transcritos importante para el desarrollo (Purpera, Giraldo, Ballard, Hylan, Godke, & Bondioli, 2009) (Wrenzycki, Herrmann, Lucas-Hahn, Korsawe, Lemme, & Niemann, 2005) (Lonergan, Fair, Corcoran, & Evans, 2006). Estudios adicionales pueden sugerir modificaciones en la condiciones de cultivo durante el desarrollo embrionario para mejorar la calidad y cantidad de la producción de embriones *in vitro*.



## A. Anexo: Escala de condiciones corporales

La siguiente tabla contiene la escala de condiciones corporales bovinas utilizada para la clasificación de las donantes de embriones en el presente estudio (Correa-Orozco & Uribe-Velásquez, 2010)

Calificación de Condición Corporal	Vértebra a la mitad del lomo	Vista posterior (corte transversal) a la altura del hueso del ilion	Vista lateral de la línea entre los huesos del ilion y el isquion	Cavidad entre la base de la cola y el hueso del isquion. Vistas posterior y angulada
Body Condition score	Vertebrae at the middle of the back	Rear view (cross section) of the hook bones	Side view of the line between the hook and pin bones	Cavity between tailhead and pin bone Rear view and Angled view
<b>Sub-condición severa</b> Severe under conditioning				
<b>Estructura obvia</b> Frame obvious				
<b>Buenas armazón y cubierta</b> Frame and covering well				
<b>Armazón no tan visible como la cubierta</b> Frame not as visible as covering				
<b>Sobre-condición severa</b> Severe over conditioning				

Fuente (adaptada de): A.J. Edmondson, I.J. Lean, C.O. Weaver, T. Farver y G. Webster, 1989. A body composition scoring chart for Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 72:68-78  
Source (adapted from): A.J. Edmondson, I.J. Lean, C.O. Weaver, T. Farver and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 72:68-78

Tabla 5. Escala de clasificación de condición corporal bovina

## **B. Anexo: Nombrar el anexo B de acuerdo con su contenido**

A final del documento es opcional incluir índices o glosarios. Éstos son listas detalladas y especializadas de los términos, nombres, autores, temas, etc., que aparecen en el trabajo. Sirven para facilitar su localización en el texto. Los índices pueden ser alfabéticos, cronológicos, numéricos, analíticos, entre otros. Luego de cada palabra, término, etc., se pone coma y el número de la página donde aparece esta información.

# Bibliografía

Mahecha, L., Gallego, L., & Peláez, F. (2002). Situación Actual de la Ganadería de Carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. *Revista Colombiana de ciencias Pecuarias* , 213-225.

Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., & Sirard, M. (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol.Reprod* , 1, 38-43.

Li, H., Liu, D., Cang, M., Wang, L., Jin, M., Ma, Y., et al. (2009). Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. . *Anim.Reprod.Sci.* , 114 (1-3), 89-98.

Perecin F, M. S. (2009). Imprinted gene expression in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. . *Genet.Mol.Res.* , 8 (1), 76-85.

Khurana, N., & Niemann, H. (2000). Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo. *Biol Reprod* , 62 (4), 847-856.

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. Dublin, Irlanda: 2nd .

Correa-Orozco, A., & Uribe-Velásquez, L. F. (2010). La condición corporal como herramienta para pronosticar el potencial reproductivos en hembras bovinas de carne. *Rev.Fac.Nal.Agr* , 63 (2), 5607-5619.

Neto a, S., Sanches, B., Binelli, M., Seneda, M., Perri, S., & Garcia, J. (2005). Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology* , 63, 1249. 1255.

- Chomczynski, p., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* , 1 (2), 581-585.
- Rio, D., Ares, M. J., Hannon, G., & Nilsen, T. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* , 6, 5439.
- Camargo, L., Freitas, C., de Sa, W., de Moraes Ferreira, A., Serapiao, R., & Viana, J. (2010). Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Anim Reprod Sci* , 120, 10-15.
- Niemann, H., Carnwath, J., Herrmann, D., Wieczorek, G., Lemme, E., Lucas-Hahn, et al. (2010). DNA methylation patterns reflect epigenetic reprogramming in bovine embryos. . *Cell Reprogram* , 12, 33-42.
- Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N., & Niemann, H. (2014). Epigenetic disorders and altered in gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* , 9, 803-815.
- 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.
- Dobbs, K., Rodriguez, M., Sudano, M., Ortega, M., & Hansen, P. (2013). Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One* , 8, e66230.
- 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, 23-35.
- Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J., Eilertsen, K., & Memili, E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. . *Theriogenology* , 78, 1869-1886.
- Smith, Z., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. . *Nat Rev Genet* , 14, 204-220.
- Bestor, T., Gundersen, G., Kolsto, A., & Prydz, H. (1992). CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet Anal Tech Appl* , 9, 48-53.
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R., & Roberts, R. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* , 274, 33002-33010.

Petrussa, L., Van de Velde, H., & De Rycke, M. (2014). Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. . *Mol Hum Reprod* , 20, 961-874.

Golding, M., Williamson, G., Stroud, T., Westhusin, M., & Long, C. (2011). Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol Reprod Dev* , 78, 306-317.

Zhao, X.-M., Ren, J.-J., Du, W.-H., Hao, H.-S., Wang, D., & Qin, T. e. (2013). Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 $\alpha$ , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. . *100*, 256-261.

Okano, M., Bell, D., Haber, D., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. . *Cell* , 99, 247-257.

Hoffmann, K., Niemann, H., Hadelers, K.-G., Herrmann, D., & Wrenzycki, C. (2006). 247 messenger RNA expression patterns of DNA and histone methyltransferases in preimplantation development of in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* , 18, 231.

Drallmeyer S, M. K.-G. (2009). 86 DNA methyltransferase (DNMT)1 and DNMT3a protein expression in pre-implantation bovine embryos derived in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev* , 21, 144.

DeChiara, T., Robertson, E., & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* , 64, 849-859.

Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., & Fundele, R. e. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* , 417, 945-948.

Velker BAM, D. M. (2012). Embryo culture and epigenetics. *Methods Mol Biol* , 912, 399-421.

Valleh, M., Hyttel, P., Rasmussen, M., & Strøbech, L. (2014). Insulin-like growth factor 2: a modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine preimplantation embryos. . *Theriogenology* , 82, 942-950.

Farin, C., Alexander, J., & Farin, P. (2010). Expression of messenger RNAs for insulin-like growth factors and their receptors in bovine fetuses at early gestation from embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* , 74, 1288-1295.

Farin, P., Piedrahita, J., & Farin, C. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* , 65, 178-191.

- Farmer, W., Farin, P., Piedrahita, J., Bischoff, S., & Farin, C. (2013). . Expression of antisense of insulin-like growth factor-2 receptor RNA non-coding (AIRN) during early gestation in cattle. *Anim Reprod Sci* , 138, 64-73.
- Young, L., Fernandes, K., McEvoy, T., Butterwith, S., Gutierrez, C., Carolan, C., et al. (2001). Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. . *Nat Genet* , 27, 153-154.
- Purpera, M., Giraldo, M., Ballard, C., Hylan, D., Godke, R., & Bondioli, K. E. (2009). Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* , 76, 783-793.
- Kirchhof, N., Carnwath, J., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H., & Niemann, H. (2000). Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* , 63, 1698-1705.
- Herrmann, D., Dahl, J., Lucas-Hahn, A., Collas, P., & Niemann, H. (2013). Histone modifications and mRNA expression in the inner cell mass and trophectoderm of bovine blastocysts. *Epigenetics* , 8, 281-189.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., & Evans, A. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* , 65, 137-152.
- Manipalviratn, S., DeCherney, A., & Segars, J. (2009). Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil.Steril* , 91 (2), 305-315.
- McGrath J, S. D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. . *Cell* , 37 (1), 179-183.
- Surani, M., Barton, S., & Norris, M. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. . *Nature* , 308 (5959), 548-550.
- Barton, S., Surani, M., & Norris, M. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. . *Nature* , 311 (5984), 374-376.
- Barton, S., Adams, C., Norris, M., & Surani, M. (1985). Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophectoderm tissues in reconstituted blastocysts in the mouse. . *J.Embryol.Exp.Morphol.* , 90, 267-285.
- Luedi, P., Dietrich, F., Weidman, J., Bosko, J., Jirtle, R., & Hartemink, A. (2007). Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. . *Genome Res.* , 17 (12), 1723-1730.

Reik, W., Constancia, M., Fowden, A., Anderson, N., Dean, W., Ferguson-Smith, A., et al. (2003). Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J.Physiol.* , 541, 35-44.

Arnold, D., Lefebvre, R., & Smith, L. Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaete scute-like homologue 2 (Mash2) gene. . *Placenta* , 27 (11-12), 1124-1131.

Curchoe, C., Zhang, S., Bin, Y., Zhang, X., Yang, L., Feng, D., et al. (2005). Promoter-specific expression of the imprinted IGF2 gene in cattle (*Bos taurus*). . *Biol.Reprod.* , 73 (6), 1275-1281.

Wagschal, A., Sutherland, H., Woodfine, K., Henckel, A., Chebli, K., Schulz, R., et al. (2008). G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta. . *Mol.Cell.Biol.* , 28 (3), 1104-1113.