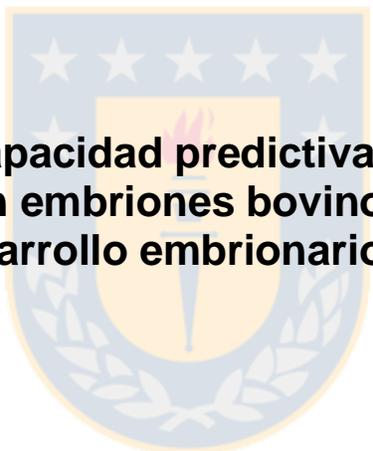




Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Faculta de Ciencias Veterinarias - Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias



**Evaluación de la capacidad predictiva de los marcadores
de pluripotencia en embriones bovinos bipartidos sobre
el potencial de desarrollo embrionario peri-implantatorio**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

ALEJANDRA ESTELA VELÁSQUEZ ÓRDENES
CHILLÁN-CHILE
2016

Profesor Guía: Lleretny Rodríguez Álvarez
Dpto. de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción



A mi familia
A mis amigos
A José
A Esperanza

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible concluir este proceso, ayudándome directa o indirectamente en el ámbito académico, científico y también en lo personal.

En primer lugar quiero agradecer profundamente a mi tutora de tesis, la Dra. Lleretny Rodríguez, quien junto al Dr. Fidel Castro me abrieron las puertas de su laboratorio en el año 2009. Llere, muchas gracias por el apoyo en todo momento, por guiarme académicamente, por la exigencia, dedicación y críticas, por despertar en mí el interés por la embriología, por animarme a seguir adelante en los momentos más complicados, por ayudarme a finalizar este proceso con éxito y por haber depositado tu confianza en mí. También le agradezco al Dr. Fidel por la confianza, por sus enseñanzas, por sus valiosos comentarios y por su apoyo en la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis.

Estoy especialmente agradecida de mi familia, un pilar muy importante en mi vida. A mi mamá, papá, hermana y sobrina, por su constante preocupación y apoyo incondicional y por haberme acompañado en todo este proceso. Además les agradezco infinitamente el haberme inculcado desde pequeña los valores de la responsabilidad y el compromiso, los cuales han sido fundamentales para ir cumpliendo mis metas en esta vida.

También quisiera agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Animal, especialmente a Daniel Veraguas, Edwin Mellisho, Paula Gallegos, Joel Cabezas, Pedro Silva, Felipe Navarrete, Daniela Rojas, Felipe Peña, gracias a todos por la colaboración constante, la simpatía y el ánimo entregado en todo el transcurso de mi tesis.

A mis amigas y amigos, Cami Troncoso, Pauly Pachá, Kari Bustos, Diana Echeverry, Aura Villamil, Claudio Zuñiga, Andrés Rodríguez, Lorna Sanhueza, Mario Bustos y Pablo Montes, muchas gracias por su compañía, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por hacer parte de ustedes mis logros y por supuesto por la linda amistad.

A mi pareja José Manríquez, muchas gracias por la compañía, el apoyo brindado, la paciencia, la complicidad y el amor, ya que sin su ayuda este proceso habría sido muy difícil.

Al Dr. José Cox, por el trabajo directo en la preparación de las hembras receptoras, en la transferencia de los embriones y por sus palabras de apoyo en los momentos más estresantes. Al Dr. Mario Briones, por aportar con sus conocimientos estadísticos en los

diseños experimentales más complejos. A la planta faenadora Frigosur, por permitirme coleccionar los ovarios que son la principal materia prima de este trabajo. Me gustaría reconocer también el apoyo de Don José Garcés, porque él siempre me brindó su ayuda desinteresada cuando lo necesité. A la Sra. Paty, Isabelita por sus palabras de ánimo y por la buena voluntad cuando necesité algún favor. A Clarita por la ayuda y disposición entregada a lo largo de todo este proceso.

También me gustaría dar las gracias a la comisión evaluadora de esta tesis, por ayudarme a mejorar este trabajo con sus críticas y comentarios constructivos.

Finalmente, gracias infinitas a Esperanza, por haber sido parte de la experiencia más enriquecedora que me ha tocado vivir, porque me enseñaste a luchar por lo que creía correcto y a no bajar los brazos, porque me hiciste crecer como persona y como profesional, porque gracias a ti me di cuenta de lo que soy capaz y que no hay límites cuando se lucha por el bienestar de un animal, me enseñaste que el cansancio no importa cuando haces las cosas con el alma y el corazón, y porque contigo experimenté una conexión única que pocas personas en el mundo han tenido el privilegio de vivir.



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LOS MARCADORES DE
PLURIPOTENCIA EN EMBRIONES BOVINOS BIPARTIDOS SOBRE EL POTENCIAL DE
DESARROLLO EMBRIONARIO PERI-IMPLANTATORIO

Aprobada por:

Lleretny Rodríguez Álvarez
Lic. Microbiología, PhD

Profesora guía

Fidel Ovidio Castro Reboredo
Ing. Zootecnista, PhD

Evaluador interno

Fernando Saravia Ramos
Med. Veterinario, PhD

Evaluador interno

Ricardo Felmer Dörner
Bioquímico, PhD

Evaluador externo

Álvaro Ruiz Garrido
Med. Veterinario, PhD

Director (s) de programa



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por:

Proyecto FONDECYT N° 11100082 (2010-2012).

Proyecto FONDEQUIP N° EQM12113

Beca CONICYT para estudios de doctorado nacional (2014-2016).



TABLA DE CONTENIDOS	Página
Índice de Figuras	x
Índice de Tablas	xiii
Índice de Anexos	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Desarrollo embrionario temprano	3
Expresión génica en embriones pre-implantatorios	5
-Transición materno-cigótica	6
-Activación del genoma embrionario	8
-Genes relacionados con la pluripotencia celular	10
-Genes relacionados con la determinación celular y funcionalidad del trofoblasto	13
Biotecnologías reproductivas	15
-Inseminación artificial	16
-Transferencia de embriones	16
Producción <i>in vivo</i> de embriones	16
Producción <i>in vitro</i> de embriones	17
-Criopreservación de ovocitos y embriones	19
-Clonación	19
Bipartición embrionaria	20
Transferencia de blastómeras (clonación embrionaria)	22
Transferencia nuclear somática (clonación somática)	22
Consecuencias del cultivo <i>in vitro</i> de embriones	23
Evaluación del desarrollo embrionario	25
-Evaluación morfológica	25
-Tasa de primera división y conteo celular	26
-Cinética de desarrollo o “time lapse”	27
-Evaluación del desarrollo embrionario posterior a la eclosión de la zona pelúcida	27
-Diagnóstico genético pre-implantatorio mediante biopsia embrionaria	28
Biopsia en etapa de segmentación	29

Biopsia de cuerpo polar	29
Biopsia en estadio de mórula	30
Biopsia en estadio de blastocisto	30
Técnicas de evaluación de expresión génica en embriones	30
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Diseño Experimental	35
Producción de embriones <i>in vitro</i>	39
Evaluación morfológica de la calidad de los blastocistos antes de la bipartición	41
Generación de demi-embryones por bipartición	41
Medición del diámetro de los demi-embryones y conteo de número total de células	41
Desarrollo embrionario peri-implantatorio <i>in vitro</i> (en placa hasta día 13)	42
Transferencia de embriones a hembras receptoras sincronizadas	42
Recuperación y evaluación de embriones en estadio peri-implantatorio (elongados)	43
Evaluación molecular de la calidad de los embriones en estadios pre y peri-implantatorios	44
-Obtención de ARN	44
-Transcripción reversa	44
Estudio cuantitativo por qPCR de genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano	45
Estudio de la expresión génica por microarreglo en embriones peri-implantatorios (embryones elongados controles y elongados bipartidos).	47
-Extracción del ARNm y síntesis del ARNc	47
-Hibridación, lavado y escáner de los microarreglos	48
-Análisis de datos	48
-Análisis de ontología de genes y vías de interacción de los genes diferencialmente expresados	49

-Validación del microarreglo mediante análisis de qRT-PCR	49
Análisis estadístico	50
3. RESULTADOS	53
Experimento 1. Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos y determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embriones generados.	53
Experimento 2. Evaluación del efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	59
Análisis de expresión génica global mediante microarreglo	66
Ontología de genes y vías de interacción	70
Validación del microarreglo mediante qRT-PCR	72
Experimento 3. Efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo embrionario bovino peri-implantatorio.	74
4. DISCUSIÓN	77
Bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación <i>in vitro</i>	77
Efecto de la bipartición sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio	81
Efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio.	88
5. CONCLUSIONES	95
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	96
7. ANEXOS	126

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos y determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embryones generados.	35
Figura 2	Evaluación del efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	37
Figura 3	Determinación del efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (<i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> y <i>NANOG</i>) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio.	39
Figura 4	Imágenes representativas de la sobrevida de los demi-embryones (12 horas posteriores a la bipartición).	54
Figura 5	Imágenes representativas de la similitud de ambos demi-embryones posterior a la bipartición.	54
Figura 6	Análisis de la similitud de la expresión génica entre demi-embryones, 12 horas después de la bipartición.	55
Figura 7	Determinación de la similitud morfológica de los demi-embryones generados después de la bipartición.	56
Figura 8	Imágenes representativas de la viabilidad embrionaria después de la bipartición, desde el día 10 hasta el día 13 de desarrollo.	56
Figura 9	Evaluación de la similitud de los demi-embryones al día 13 del desarrollo.	57
Figura 10	Análisis de la similitud en la expresión génica entre los demi-embryones al día 13 de desarrollo.	58
Figura 11	Diámetro de embryones bovinos cultivados en sistema convencional (plástico) desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo.	60

Figura 12	Expresión génica en embriones bovinos al día 13 de desarrollo <i>in vitro</i> en sistema convencional (plástico).	61
Figura 13	Diámetro de embriones bovinos cultivados en sistema de co-cultivo desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo.	62
Figura 14	Expresión génica en embriones bovinos al día 13 de desarrollo <i>in vitro</i> en sistema de co-cultivo.	63
Figura 15	Embriones elongados colectados al día 17 de desarrollo.	64
Figura 16	Microfotografías de embriones elongados colectados al día 17 de desarrollo.	65
Figura 17	Análisis de expresión génica de embriones elongados de 17 días de desarrollo derivados de la transferencia de blastocistos bipartidos y controles (sin bipartir).	66
Figura 18	Análisis de la integridad de ARN por Agilent 2200 TapeStation System.	67
Figura 19	Descripción general de los genes diferencialmente expresados en los embriones elongados de 17 derivados de blastocistos bipartidos y controles.	67
Figura 20	Agrupamiento jerárquico de todos los genes diferencialmente expresados (383 genes en total).	68
Figura 21	Redes de interacción obtenidas con el programa Gene Mania Prediction Server.	72
Figura 22	Validación del microarreglo mediante qRT-PCR usando la expresión relativa de genes seleccionados.	73
Figura 23	Análisis de correlación para la validación del microarreglo mediante qRT-PCR.	73
Figura 24	Expresión relativa de genes de pluripotencia en demi-embriones de día 9 de desarrollo cuya contraparte no (D9 sin desarrollo) o si se desarrolló (D9 con desarrollo) hasta el día 13 de cultivo <i>in vitro</i> .	76

Figura 25 Expresión relativa de genes de pluripotencia en demi-embryones al D9 que lograron un buen desarrollo hasta el día 13 y sus contrapartes al día 13.

76



ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real.	46
Tabla 2	Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real para la validación del microarreglo.	51
Tabla 3	Tasa de sobrevivencia de demi-embriones posterior a la bipartición.	53
Tabla 4	Desarrollo <i>in vitro</i> de demi-embriones bovinos desde el día 9 al día 13.	57
Tabla 5	Desarrollo embrionario desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo <i>in vitro</i> en sistema convencional (plástico).	60
Tabla 6	Desarrollo embrionario desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo <i>in vitro</i> en sistema de co-cultivo.	62
Tabla 7	Desarrollo <i>in vivo</i> de embriones bipartidos y controles hasta el día 17.	65
Tabla 8	Top 40 de genes diferencialmente expresados (DEGs) entre embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos.	69
Tabla 9	Análisis de ontología de genes a partir de genes desregulados en embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos y controles.	71
Tabla 10	Resultados de los qRT-PCR de los genes seleccionados para la validación del microarreglo.	74

Tabla 11 Análisis de correlación de la expresión de los marcadores de pluripotencia al D9 de desarrollo con diámetro embrionario y expresión de genes trofoblásticos al D13 de desarrollo de las contrapartes.

76



ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 Medio de manipulación <i>in vitro</i> de embriones	126
Anexo 2 Medio de maduración <i>in vitro</i> de embriones	127
Anexo 3 Medio Percoll	128
Anexo 4 Medio de capacitación espermática	129
Anexo 5 Medio de fertilización <i>in vitro</i>	130
Anexo 6 Medio de cultivo <i>in vitro</i> SOF (fluido oviductal sintético)	131



RESUMEN

La producción *in vitro* de embriones ha sido ampliamente utilizada en diversas especies, no obstante, esta tecnología aún presenta limitaciones que afectan a la competencia del desarrollo embrionario. El reducido potencial de desarrollo es atribuido a la manipulación de los gametos y embriones, lo cual puede tener consecuencias en el desarrollo pre-implantatorio. En el estadio de blastocisto, el embrión experimenta cambios que son el resultado de una expresión génica estrictamente regulada. Existen genes que son cruciales para lograr un correcto desarrollo embrionario, y la ineficiencia en la producción de embriones podría estar causada por una desregulación en la expresión de estos marcadores. Por lo tanto, surge la necesidad de tener una cinética real de expresión génica de lo que pasa en el embrión tras continuar su desarrollo peri-implantatorio. Para ello, una alternativa es generar demi-embryones obteniendo así dos mitades que son cada una el reflejo genético de la otra. El objetivo de esta investigación es evaluar el uso de la bipartición en el estadio de blastocisto como método para validar la capacidad predictiva de los marcadores de pluripotencia sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio.

Para establecer un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro*, se realizó la bipartición a los días 7, 8 ó 9 y estadios temprano, expandido y eclosionado. Se obtuvieron mayores tasas de sobrevivencia y viabilidad en ambos demi-embryones al bipartir blastocistos al D8 y D9. Sin embargo, se escogió el D8 de desarrollo y estadio de blastocisto eclosionado para los siguientes experimentos.

Para determinar el efecto inmediato de la bipartición de blastocistos bovinos, se realizó evaluación morfológica (medición del diámetro y número total de células) y molecular (expresión génica mediante q-RT-PCR) de ambos demi-embryones. Aproximadamente un 70% de los pares de demi-embryones tenían similar tamaño y número total de células. No se observaron diferencias en los niveles de expresión entre ambos demi-embryones en todos los genes analizados (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, *TP1* y *BAX*). Por lo que la bipartición de blastocistos bovinos genera demi-embryones al D9 con características morfológicas y moleculares similares.

Para determinar el efecto tardío de la bipartición de blastocistos bovinos al día 13 de desarrollo *in vitro*, se realizó evaluación morfológica (medición del diámetro) y evaluación molecular (expresión génica mediante q-RT-PCR) de ambos demi-embryones generados. Sólo en el 63,6% de los demi-embryones generados no se encontraron diferencias en el diámetro de éstos. La evaluación molecular mostró diferencias en todos los genes

analizados (*OCT4*, *SOX2*, *CDX2*, *TP1*, *TKDP1* y *EOMES*), excepto *BAX*. Por lo que la bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro* genera demi-embryones al D13 con características morfológicas y moleculares diferentes.

Además, se evaluó el efecto de la bipartición embrionaria sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio, tanto *in vitro* como *in vivo*. Para el cultivo *in vitro* de los embryones, se consideraron dos condiciones (cultivo en plástico y co-cultivo en células endometriales). Los embryones cultivados en plástico, mostraron diferencias en el diámetro solo en el D9 y D10 de desarrollo. En cuanto a la expresión de los marcadores estudiados, se observó una tendencia a una mayor expresión en los embryones controles siendo esto significativo para los genes *CDX2* y *TP1*. En el caso de los embryones co-cultivados con células endometriales, no se observaron diferencias en la sobrevivencia entre embryones bipartidos y controles hasta el D13 de desarrollo. Tanto los embryones bipartidos como controles tuvieron una curva de crecimiento similar donde se observó un crecimiento lineal desde el D9 hasta el D12, sin embargo a partir de este día se observó una disminución en el diámetro embrionario, similar en ambos grupos. En cuanto a la expresión génica, la expresión de *TP1* es significativamente menor en los embryones bipartidos.

Para evaluar el efecto de la bipartición en el desarrollo peri-implantatorio *in vivo*, se transfirieron demi-embryones y embryones (controles) a hembras receptoras, los cuales fueron colectados el D17 de desarrollo. No se observaron diferencias en la tasa de recuperación y en la longitud media de los embryones elongados entre ambos grupos. Además, se estudiaron los patrones de expresión génica individual (q-RT-PCR) y global (microarreglo). Se observó mediante q-RT-PCR una sub-expresión de los marcadores *OCT4*, *SOX2*, *TP1* y *EOMES* en los embryones derivados de blastocistos bipartidos y se demostró mediante microarreglo, que la bipartición de blastocistos bovinos, afecta la transcriptómica de los embryones elongados al D17, principalmente regulando genes cruciales involucrados en la remodelación de la matriz, control del crecimiento y detoxificación y control del transporte de metabolitos.

Finalmente, se demostró que la expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto, no se correlacionan positivamente con el potencial de desarrollo peri-implantatorio de embryones bovinos producidos por fecundación *in vitro*.

Palabras clave: blastocisto bovino, bipartición, demi-embryones, elongación, expresión génica.

ABSTRACT

In vitro embryo production has been widely used between different species; nevertheless, this technology has still some limitation that affects embryo development. This poor development is attributed to embryos and gamete manipulation, causing negative effects on embryo development during pre-implantation stage. Embryos presents changes during blastocyst stage as result of a strictly regulate gene expression. Some genes are considered crucial for a successfully development of embryos; therefor an inefficiency on embryo development could be caused for the deregulated expression of these markers. For this reason, the necessity of know the real kinetic of embryo gene expression during peri-implantation stage is crucial. To generate this knowledge, it is necessary produce two genetically homogenous embryos; demi-embryos, that can be compared to each other. The aim of this research was to evaluate embryo splitting on blastocyst stage as a method to validate predictive capacity of pluripotency markers expression on development potential through peri-implantation stage.

To establish a splitting protocol bovine blastocyst were produced using *in vitro* fertilization; and splitting was done on different days (7, 8 and 9) and development stages (early-blastocyst, expanded-blastocyst and hatched-blastocyst). Split hatched-blastocyst at day 8 presents the highest survival rates and viability in both demi-embryos. For this reason; the next experiments were realized using hatched-blastocyst at day 8 of development.

To determinate the immediately effect of splitting bovine blastocyst; morphological (diameter and total cells number) and molecular (gene expression using q-RT-PCR) assessment of both demi-embryos was realized. Approximately 70% of demi-embryos pairs presents similar size and total cells number; and no differences were observed on gene expression of *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, *TP1* and *BAX* genes. Thus, bovine blastocyst splitting generates demi-embryos at day 9 with similar morphological and molecular characteristics.

To determinate the late effects of bovine blastocyst splitting at day 13 of development *in vitro*; morphological (diameter and total cells number) and molecular (gene expression using q-RT-PCR) assessment of both demi-embryos was realized. A 63.6% of generated demi-embryos did not present differences on diameter. Molecular assessment presents differences on *OCT4*, *SOX2*, *CDX2*, *TP1*, *TKDP1* and *EOMES* genes; but *BAX*. Thus, bovine blastocyst splitting generates demi-embryos at day 13 with differences on morphological and molecular characteristics.

Effects of embryo-splitting on development capability during peri-implantation stage was assessed *in vivo* and *in vitro*. *In vitro* embryo-culture consider two conditions; plastic and co-culture with endometrial cells. Embryos cultured on plastic; presents differences on the diameter only days 9 and 10 of development. A tendency of a higher expression for assessed markers was found on control-embryos; being statistically significant *CDX2* and *TP1* genes. For co-cultured embryos with endometrial cells; no differences were observed between split and control embryos through day 13 of development. Split and control embryos presents similar growth curve from day 9 through day 12; nevertheless, from day 12 a reduction on embryo diameter was similarly observed in both groups. The expression of *TP1* was significantly lower in split embryos. *In vivo* splitting effects on peri-implantation development were assessed transferring demi-embryos and embryos (controls) to recipient cattle; and collecting them at day 17 of development. No differences were observed for embryo-recovery rates and media length for elongated embryo between groups. Additionally, gene expression patterns were evaluated individually (q-RT-PCR) and globally (microarray). A downregulated expression of *OCT4*, *SOX2*, *TP1* and *EOMES* from split embryos was observed in q-RT-PCR analysis; and microarray demonstrate that bovine splitting affects the transcriptomics of elongated embryos at day 17; regulating principally crucial genes involved on matrix remodeling; growth control and; metabolites detoxification and control.

Finally, the expression of pluripotency markers (*OCT4*, *SOX2* and *NANOG*) on blastocyst stage was not positively correlated with the potential of development during peri-implantation stage of bovine-embryos produced by *in vitro* fertilization.

Keywords: bovine blastocyst, splitting, demi-embryos, elongation, gene expression.

1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones ha sido ampliamente utilizada en diversas especies, tales como ratón, bovinos, ovinos y humanos, entre otras. No obstante, esta tecnología aún presenta limitaciones que afectan a la competencia de desarrollo del embrión y su capacidad para generar una gestación exitosa. Los embriones producidos por fecundación *in vitro* tienen un reducido potencial de desarrollo, lo que resulta en bajas tasas de implantación y en alto número de pérdidas de gestaciones, debido a anomalías en el embrión o a una placentación inadecuada. En rumiantes, esta ineficiencia resulta en un impacto económico negativo debido a los costos asociados al mantenimiento de vacas receptoras vacías. El reducido potencial de desarrollo es atribuido a la manipulación de los gametos y embriones, ya sea por manipulación física o por inadecuados sistemas de cultivo *in vitro*, lo cual ha demostrado tener consecuencias en el desarrollo embrionario pre-implantatorio. A pesar de los esfuerzos en optimizar los protocolos y condiciones *in vitro*, no se ha logrado incrementos significativos en la producción de crías viables.

Los embriones producidos *in vitro*, independientemente de su información genética, responden de forma diferente e individual a las condiciones *in vitro*. Es por ello que se observa tanta variabilidad en la competencia de embriones producidos, incluso, bajo las mismas condiciones. Por esta razón, resulta importante seleccionar los embriones con mayor competencia de desarrollo para asegurar mayores tasas de implantación y por ende, el éxito de la gestación.

La evaluación morfológica de los embriones ha sido utilizada como método de selección en la mayoría de las especies. Sin embargo, este criterio basado en la clasificación visual resulta ser subjetivo. Algunos estudios reportan que, incluso embriones que son clasificados como grado I (excelente calidad) son incapaces de llevar a cabo una gestación normal, por los inconvenientes antes mencionados. En bovinos, esta selección se realiza principalmente en el estadio de blastocisto. En esta etapa, el embrión experimenta cambios (diferenciación celular) que son el resultado de una expresión génica estrictamente regulada. Existen genes que son cruciales para lograr un correcto desarrollo embrionario, como marcadores de pluripotencia, marcadores de la función trofoblástica y genes involucrados en la comunicación con el ambiente materno. La ineficiencia en la producción de embriones, podría estar causada por una desregulación en la expresión de genes cruciales para el correcto desarrollo embrionario. Por lo tanto resulta muy interesante estudiar la expresión génica en esta etapa de desarrollo.

En estudios realizados anteriormente, se ha reportado la cinética de expresión génica de embriones bovinos. Sin embargo, en esos estudios no se realiza la evaluación del mismo embrión en los distintos estadios de desarrollo dado el carácter invasivo de las técnicas utilizadas para evaluar expresión génica. Por lo tanto, surge la necesidad de tener una cinética real de lo que pasa en el embrión tras continuar su desarrollo peri-implantatorio. Para ello, es necesario generar demi-embryones para obtener dos mitades que son cada una el reflejo genético de la otra. La bipartición embrionaria es una técnica que surgió a partir de la necesidad de aumentar el número de embriones disponibles para transferencia y además como herramienta para realizar diagnósticos genéticos en el embrión.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto como método para validar la capacidad predictiva de la expresión de marcadores de pluripotencia sobre el potencial de desarrollo embrionario hasta el estadio peri-implantatorio.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desarrollo embrionario temprano

El desarrollo embrionario es el proceso por el cual el ovocito fecundado o cigoto comienza a desarrollarse para dar lugar a un embrión. Después de la liberación desde el folículo, el ovocito es atrapado por las fimbrias del infundíbulo y dirigido al interior del oviducto a través de la actividad ciliar. El ovocito, es una célula de 150-190 μm de diámetro, rodeado por la zona pelúcida, una capa glicoproteica de 12 a 15 μm de espesor que es producida por el ovocito (Dietl, 1986). Esta matriz tiene numerosas funciones, entre ellas están la protección mecánica del ovocito y la comunicación de éste con las células de los folículos durante la ovogénesis (Wassarman *et al.*, 1999), ofrece sitios de unión a espermatozoides (Breed *et al.*, 2002), promoviendo así la reacción del acrosoma e impidiendo la poliespermia (Bleil y Wassarman, 1983), protege al embrión hasta el estado de blastocisto (Wassarman *et al.*, 1999), facilita las uniones entre las blastómeras durante la compactación y modula la transmisión de señales entre el embrión y el ambiente materno (Herrler y Beier, 2000).

El desarrollo embrionario temprano se inicia con la fertilización del ovocito cuando es penetrado por el espermatozoide fecundante, lo cual resulta en la formación del cigoto (Noden y de Lahunta, 1990). La primera división celular después de la fecundación da origen a un embrión de dos células, estas células embrionarias denominadas blastómeras continúan sucesivas divisiones. Durante las primeras divisiones mitóticas, solo ocurre un aumento del número de células pero no del tamaño de estas, este proceso es denominado segmentación (Noden y de Lahunta, 1990). Durante las primeras divisiones celulares solo hay transcripción basal a partir del genoma embrionario, por lo que todos los procesos celulares ocurren a partir de los ARNm y proteínas maternas, acumuladas durante el crecimiento y maduración ovocitaria. Más tarde ocurre un proceso denominado transición materno-cigótica donde se produce la activación del genoma embrionario (AGE) donde hay un aumento de la transcripción (Bell *et al.*, 2008). A partir de este punto, los procesos celulares están regulados por la expresión del genoma embrionario.

En bovinos, la primera división celular se produce entre las 18 y 24 horas después de la fecundación y a los cuatro días el embrión contiene entre 16 y 32 células, en este período comienzan a formarse uniones estrechas entre las células llevando a cabo la compactación, alcanzando el estadio de mórula al día 5-6 (Noden y de Lahunta, 1990). Las divisiones y

formación de uniones estrechas entre las blastómeras, genera que éstas se caractericen por exhibir diferentes patrones de polaridad celular, es decir, poseen una distribución asimétrica de ciertas moléculas responsables de la diferenciación celular. Por lo tanto, las blastómeras situadas en la parte interna del embrión presentan diferentes patrones de expresión génica y acumulación de proteínas que las situadas en el exterior (Eckert *et al.*, 2008; Rossant y Tam, 2009). Las blastómeras en la parte interna del embrión, están destinadas a formar el macizo celular interno (MCI), mientras que las células de la cara externa del embrión, están destinadas a diferenciarse en trofoectodermo que más tarde formará el trofoblasto (TB) embrionario. El destino celular puede determinarse ya en la etapa de 4-8 células en ratón y depende de las diferencias entre la interacción de factores de transcripción y sus dianas (Plachta *et al.*, 2011). Por lo tanto, la compactación es un proceso esencial para la diferenciación celular y fundamental para dar lugar a un embrión viable.

Posterior a la compactación, ocurre un proceso denominado cavitación, donde las células del trofoectodermo secretan fluido para crear el blastocele y la estructura resultante se denomina blastocisto el cual se forma alrededor del día 7 en bovinos. Durante este período, se hace evidente la primera diferenciación celular con la formación del MCI y TB (Degrelle *et al.*, 2005). El MCI da origen principalmente a tejido embrionario, mesodermo extra-embrionario y endodermo primitivo, mientras que el TB da origen a tejido placentario (Degrelle *et al.*, 2005). En este estadio, el embrión tiene alrededor de 120 células de las cuales aproximadamente el 25% pertenecen al MCI y el 75% al TB (Morris *et al.*, 2000). El blastocisto bovino permanece dentro de la zona pelúcida hasta el día 7 posterior a la fecundación, midiendo aproximadamente 200 μm y conteniendo alrededor de 150 células (Morris *et al.*, 2000). Después de la formación del blastocisto, el embrión sufre un segundo proceso de diferenciación celular donde el MCI se diferencia en epiblasto e hipoblasto y eliminación del trofoectodermo polar que cubre el epiblasto, lo que resulta en el establecimiento del disco embrionario (Vejlsted *et al.*, 2006). La expansión del trofoblasto provee un aumento en el área para facilitar la comunicación materno-fetal, lo que permite una correcta implantación (Stroband y van der Lende, 1990).

Luego de eclosionar de la zona pelúcida, se produce un proceso en el cual el embrión genera un estrecho contacto con la pared uterina llamado implantación. El blastocisto comienza a experimentar una etapa de rápido desarrollo, proliferación y crecimiento, dichos cambios van a depender de la especie, existiendo especies de implantación temprana e implantación tardía (Geisert y Malayer, 2002). En especies de implantación temprana, como

ratón y humanos, el embrión llega al útero y eclosiona de la zona pelúcida implantándose de inmediato en la pared uterina. Una vez en contacto con el endometrio, el trofoblasto secreta un conjunto de proteasas que se encargan de digerir proteínas de la matriz extracelular del tejido uterino, lo que permite al blastocisto implantarse (Strickland *et al.*, 1976; Brenner *et al.*, 1989). Estos son procesos vitales para la supervivencia embrionaria y la formación de una placenta funcional.

En bovinos, la implantación es tardía, esto quiere decir que los blastocistos expandidos una vez que eclosionan de la zona pelúcida, continúan su desarrollo a través de una activa proliferación celular, proceso denominado elongación. La elongación del embrión implica incrementos en longitud y peso del trofoblasto (Wales y Cuneo, 1989), además del inicio de la gastrulación y diferenciación de las membranas extraembrionarias, incluyendo la formación del saco vitelino y alantoides (Guillomot, 1995). Se reconocen tres fases de elongación: la fase temprana o esférica (entre los días 9 y 12), la fase ovoide (entre los días 12 y 14) y la fase filamentosa o tardía (entre los días 15 y 21) (Degrelle *et al.*, 2005).

Expresión génica en embriones pre-implantatorios

El desarrollo embrionario pre-implantatorio se describe como una de las etapas más críticas del desarrollo embrionario en mamíferos. Estas primeras etapas implican tanto cambios morfológicos como bioquímicos, que están estrechamente relacionados con la actividad genómica y un conjunto de procesos fisiológicos, muchos de los cuales aún son desconocidos. Estos procesos fisiológicos son controlados por varios mecanismos moleculares, los cuales cumplen un rol fundamental en la coordinación de procesos homeostáticos y metabólicos (Gad *et al.*, 2012), los que se regulan a través de una equilibrada expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000).

La expresión génica en la etapa pre-implantatoria se caracteriza por dos fases cinéticas: 1) cuando las proteínas son sintetizadas desde el ARNm materno acumulados durante la maduración oocitaria y 2) cuando el genoma embrionario es activado y comienza a dirigir el desarrollo conducido por una intensa transcripción y traducción del nuevo genoma. Los genes involucrados en esta etapa son responsables de mantener el metabolismo y, así poder dirigir los eventos cruciales para el desarrollo temprano, tales como la determinación del destino celular y la activación del genoma embrionario (Hendriksen *et al.*, 2000).

Transición materno-cigótica

Los ovocitos poseen diferentes características en cuanto a forma, tamaño y componentes moleculares. A pesar de esta heterogeneidad, todos los ovocitos tienen como propósito la unión de los genomas parentales para la formación de un nuevo genoma embrionario (Latham y Schultz, 2001). Las diferencias en las características ovocitarias, derivan de los componentes citoplasmáticos maternos que suministran los ovocitos, tales como, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas que se han ido almacenando durante la ovogénesis (Latham y Schultz, 2001). Estos factores son los responsables de mantener el metabolismo y así, poder dirigir los eventos cruciales para el desarrollo temprano, dichos factores capacitan al ovocito con el fin de optimizar el desarrollo folicular, la maduración de las células germinales, el desarrollo embrionario temprano y particularmente, la activación del genoma embrionario, lo cual que es necesario para la transición de un control materno del desarrollo a un control exclusivamente embrionario (Tadros y Lipshitz, 2009).

Estudios han demostrado que el origen y calidad de los ovocitos, están estrechamente relacionados con la determinación de la tasa de desarrollo embrionario (Hendriksen *et al.*, 2000). Por lo tanto, a partir de esto se ha logrado demostrar que el ambiente al cual se expone el ovocito durante la maduración embrionaria influye en el patrón de transcritos en el ovocito maduro y posteriormente en el blastocisto (Lonergan *et al.*, 2003; Russel *et al.*, 2006). En consecuencia, el embrión depende del ARNm materno almacenado al menos hasta la transición materno-cigótica, por esta razón es necesario acumular y almacenar los ARNm y proteínas durante la ovogénesis (Bell *et al.*, 2008).

El potencial de desarrollo embrionario depende del equilibrio de las reservas maternas acumuladas por el ovocito durante el crecimiento folicular y, de la subsiguiente pérdida de estas reservas con el envejecimiento de los ovocitos y divisiones embrionarias (Meirelles *et al.*, 2004). Reafirmando lo anterior, los resultados observados en el proceso de clonación por transferencia nuclear somática, serían atribuibles a la capacidad inherente del ovocito para transformar núcleos diferenciados en núcleos embrionarios adecuadamente reprogramados (Cibelli *et al.*, 1998; Wakayama *et al.*, 1998). Esta característica se debe probablemente a la calidad del citoplasma heredado, pudiendo correlacionarse a una transición materno-cigótica más funcional (Latham y Schultz, 2001).

Después de la fertilización, se produce una degradación y deadenilación de los ARNm maternos, se describe que esta degradación puede llegar a ser hasta un 40% y la deadenilación de hasta un 70% (Bachvarova y De Leon, 1980; Clegg y Piko, 1982). Es

probable que esta degradación de los ARNm maternos después de la fertilización sean perjudiciales para el desarrollo embrionario posterior (Alizadeh *et al.*, 2005).

Se han descrito varios ARNm maternos que son requeridos para soportar el desarrollo temprano, el primer factor ovocitario identificado en ratón fue *MATER* (maternal-antigen-that-embryos-require), responsable del desarrollo embrionario más allá de la etapa de dos células (Tong *et al.*, 2000). Recientemente, se ha descubierto otro factor denominado *FILIA* (KH domain containing 3), éste actúa uniéndose a *MATER* para así mantener la euploidía durante las divisiones (Zheng y Dean, 2009). Otro factor importante es *STELLA*, también conocido como Dppa3 (developmental pluripotency-associated 3) (Payer *et al.*, 2003), su función es proteger el genoma materno de la oxidación de citosinas metiladas lo que es importante para una correcta remodelación epigenética de genes maternos lo cual se traduce en un adecuado desarrollo embrionario (Bakhtari y Ross, 2014). *ZAR1* (zygote arrest 1) es un factor materno específico, el cual desempeña un papel esencial durante la transición ovocito-embrión (Wu *et al.*, 2003). *ZFP36L2* (ZFP36 ring finger protein-like 2) es un factor crítico en la fertilidad de la hembra, ya que una expresión aberrada de este gen conlleva a la detención del desarrollo embrionario temprano en el estadio de dos células (Ramos *et al.*, 2004). Finalmente, estudios sugieren que el factor *NPM2* (nucleophosmin/nucleoplasmin 2) podría estar involucrado en la remodelación de la cromatina (Burns *et al.*, 2003).

Por otro lado, la apoptosis es otra evidencia de la importancia de una adecuada acumulación de factores en el período ovocitario. Estudios señalan que la capacidad de desarrollo estaría influenciada por la presencia de factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos acumulados en los citoplasmas y la supervivencia del embrión estaría influenciada por el equilibrio continuo de estos factores (Menezo, 2006). El ARNm materno y la reserva de proteínas en los ovocitos disminuyen con el tiempo, comprendiendo una oportunidad de control post-transcripcional muy estrecha y la sustitución gradual de estas proteínas por transcripciones del embrión y sus productos de traducción (Brevini *et al.*, 2002).

La transición materno-cigotica consta de varios eventos que son requeridos durante la preimplantación del embrión, como:

1. Degradación de los transcritos maternos del ovocito. Al parecer, esta degradación es un mecanismo que dirige el inicio del desarrollo (Maleszewski *et al.*, 1996).

2. Reemplazo de los transcriptos maternos en el ovocito, por nuevos transcriptos, ahora de origen embrionario. Si éstos no se reemplazan, el desarrollo se ve alterado por la incapacidad del embrión de ejercer sus funciones celulares básicas.
3. Reprogramación del patrón de expresión génica en el embrión (Yu *et al.*, 2001).

Activación del genoma embrionario.

La activación del genoma embrionario (AGE) se describe como el momento en que el embrión pasa de utilizar el ARNm derivado del genoma materno a activar su propio genoma (Schultz, 1993). Durante este período, el embrión comienza a sintetizar su propio ARNm y proteínas, con el fin de alcanzar estadios de desarrollo más complejos (Schultz, 1993). La AGE es considerado como el período más crítico para el embrión durante el desarrollo temprano (Meirelles *et al.*, 2004). Además, está asociada con eventos de diferenciación, éxito de la implantación y desarrollo fetal (Niemann y Wrenzycki, 2000). Se ha demostrado que esta transición comprende una serie de sucesos que involucran una expresión génica altamente regulada (Zeng *et al.*, 2004). Además, estudios evidencian que la mayoría de los transcriptos sintetizados en esta etapa, se traducen rápidamente (Flach *et al.*, 1982).

La comprensión de la temporización de la AGE ha ido cambiando, a partir de investigaciones realizadas en ratones y basados en el análisis de expresión de proteínas. En esta especie, la AGE ocurre durante la etapa de 2 células, caracterizada por un evento de menor activación al inicio de esta etapa y un evento de mayor activación al final de la misma (Bensaude *et al.*, 1983 y Conover *et al.*, 1991). Sin embargo, otros estudios, donde se detectó síntesis de ARN, indican que existe transcripción en estadio de cigoto (Clegg y Piko, 1982). A partir de esto, nuevas investigaciones demostraron que, tanto la transcripción de transgenes en el caso de ratones transgénicos, como de genes endógenos, ocurrían al final de la etapa de una célula (Aoki *et al.*, 1997 y Vemet *et al.*, 1992). Adicionalmente, se ha concluido que la activación del genoma en ratones comprende una serie de eventos que ocurren gradualmente, donde se han identificado cuatro períodos: al final de la etapa de una célula; la etapa temprana de dos células; la etapa tardía de dos células y; la etapa de 8 células. En otras especies animales, tales como conejos, bovinos y humanos, el principal evento de activación se produce en torno a la etapa de 4-8 células. También se ha reportado un grado limitado de transcripción en etapas más tempranas, lo que confirmaría el patrón gradual de activación en varias especies de mamíferos (Ao *et al.*, 1988; Braude *et al.*, 1988). En ratones, bovinos y conejos, la principal activación del genoma es precedida por una menor transcripción embrionaria en un entorno transcripcionalmente represivo (Nothias et

al., 1995). Esta menor transcripción embrionaria ocurre al inicio de la primera división celular en ratones y conejos, en bovinos se ha descrito que ocurre en el estadio de dos células (Aoki *et al.*, 1997). Un estudio realizado en embriones murinos de dos células, tratados con alfa-amanitina, (Latham *et al.*, 1991) determinó que, al final de la activación del genoma, se sintetizan 38 polipéptidos sensibles a la represión transcripcional por este fármaco. Por lo tanto, esta investigación permitió estimar que dicha activación representa el 3% de todos los polipéptidos presentes en esta etapa de desarrollo. Otros estudios sugieren que este número se subestima (Ko, 2004). Hasta el 10% de los ARNm maternos persisten hasta la etapa de blastocisto, por lo que podrían tener un importante papel en la aseguración de la óptima activación del genoma embrionario (Bachvarova y De León, 1980).

La transición que ocurre durante la AGE es crucial para la reprogramación del genoma y la adquisición de la capacidad totipotente del embrión (Baroux *et al.*, 2008). Las modificaciones epigenéticas ocurridas durante la AGE están involucradas en la regulación de la expresión génica del embrión y juegan un papel fundamental en el control de eventos de reprogramación durante la embriogénesis temprana (Li, 2002). Es evidente que los embriones deben superar un estado de represión para iniciar la activación transcripcional del genoma. Una inadecuada regulación, en relación al tiempo de activación y los tipos de genes expresados, puede conducir a la detención del desarrollo embrionario (Latham y Schultz, 2001). Por ejemplo, podría existir una incapacidad de mantener el equilibrio hacia los factores anti-apoptóticos, lo cual podría iniciar la cascada que conlleva al bloqueo del desarrollo y posterior muerte del embrión (Meirelles *et al.*, 2004).

Los genes heredados por el embrión deben ser modificados a fin de asegurar un apropiado funcionamiento del genoma. Estas modificaciones, que se conocen con el nombre de programación epigenética, involucran cambios bioquímicos sin alterar la secuencia del gen y son muy importantes en el embrión preimplantatorio porque controlan el crecimiento y desarrollo embrionario (de Rycke *et al.*, 2002). El principal mecanismo epigenético propuesto a través del cual se produce la activación del genoma embrionario, es la remodelación de la cromatina, lo que implica modificaciones post-traduccionales (como metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación) de proteínas histonas, metilación del ADN y unión de otras proteínas a la cromatina (Bell *et al.*, 2008). Un factor determinante de la estructura de la cromatina es el tipo de histonas asociadas al ADN (Landsberger y Wolffe, 1995). Estas proteínas se encargan de empaquetar el ADN formando los nucleosomas (histonas 2A; 2B, 3, 4). Adicionalmente, existen otras histonas encargadas de enlazar los nucleosomas (variantes de la histona H1, B4 y HMG1), generando finalmente la

condensación de la cromatina. Esta asociación puede ser modulada por procesos de fosforilación y acetilación. De ellos, la acetilación de los residuos de lisina en las colas de las histonas reduce el contacto del ADN con las histonas y hace que el ADN sea accesible a factores de transcripción (Wade *et al.*, 1997). La cromatina transcripcionalmente inactiva, se caracteriza por poseer histonas principalmente desacetiladas, metilación de la histona H3 en la lisina 9 y metilación del ADN. Por el contrario, cuando se produce acetilación de la histona H3 y H4, metilación de la histona H3 en la lisina 4 y bajos niveles de metilación del ADN, la cromatina es transcripcionalmente activa (Bell *et al.*, 2008). Estas modificaciones alteran la estructura de la cromatina para proporcionar acceso a los factores reguladores de la transcripción que controlan la expresión génica (Fulka *et al.*, 2008).

Posterior a la fertilización, el genoma embrionario se somete a una demetilación pasiva del ADN, donde gran parte del genoma se encuentra demetilado en la etapa de mórula. A continuación de esto, ocurre una nueva metilación del genoma en el estadio de blastocisto, que es donde se evidencian las primeras diferenciaciones celulares (Morgan *et al.*, 2005). En ratones, la activación del genoma embrionario es principalmente generada por un mejor acceso a los factores de transcripción al genoma embrionario después de la remodelación de la cromatina. Estos factores incluyen *OCT4/POU5F1* (Octamer-binding transcription factor-4/POU class 5 homeobox 1) y *SOX2 SRY* (sex determining region Y)-box 2 (Li *et al.*, 2010), y se expresan durante la ovogénesis, donde sus transcritos y proteínas persisten en el embrión temprano. Los patrones de expresión de dichos factores señalan que poseen funciones en el desarrollo embrionario antes y después de la AGE (Palmieri *et al.*, 1991; Avilion *et al.*, 2003).

Genes relacionados con la pluripotencia celular

El desarrollo embrionario temprano está controlado primero por los genes maternos y posteriormente por los genes embrionarios una vez que se produce la transición materno-embrionaria. Antes de la primera diferenciación celular, las células embrionarias son totipotentes gracias a las modificaciones epigenéticas que tienen lugar durante esta etapa. La potencia de estas células es mantenida por factores de transcripción como *OCT4/POU5F1* y *SOX2* primero suministrados por las reservas maternas y después sintetizados por el genoma embrionario (Li *et al.*, 2010).

OCT4 pertenece a la familia POU de factores de transcripción. POU es una familia de proteínas con homodominios conservados, la sigla deriva de los nombres de tres factores de transcripción: Pit1 (factores pituitaria específicos), Octamer *OCT1* y *OCT2*, Unc-86 factor

de transcripción neural de *Caenorhabditis elegans*, en general tienen un rol importante en el desarrollo embrionario y funcionamiento del sistema nervioso (Latchman, 1999). El grado de semejanza del gen de *OCT4* y de la proteína entre las especies sugiere que este gen juega un papel similar en todos los mamíferos, siendo necesaria su expresión en todo el desarrollo temprano para la correcta formación y supervivencia embrionaria (Niwa *et al.*, 2000).

El gen *OCT4* es de los factores de transcripción que se traduce más tempranamente en embriones y el que tiene mayor efecto en el desarrollo murino pre-implantatorio y el cual es expresado durante todo este período (Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990) dependiendo, dicho efecto, de su concentración en el núcleo (Niwa *et al.*, 2000).

Scholler y colaboradores (1989), demostraron por primera vez la actividad transcripcional en la embriogénesis de ratón, indicando que *OCT4* está activo en el desarrollo murino temprano (Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990). También se describe que en murinos, la expresión de *OCT4* en el cigoto se evidencia antes de la etapa de 8 células, luego se detecta en la etapa de 8-16 células, es abundante y uniforme en todas las células en etapa de mórula, aumentando en la etapa de blastocisto temprano y luego declina a finales de este estadio (Yeom *et al.*, 1991; Palmieri *et al.*, 1994).

Cuando ocurre la diferenciación celular en el blastocisto murino (MCI y TB), la expresión de *OCT4* se restringe al MCI. Además, se requiere de un cierto nivel de expresión de este gen para mantener la pluripotencia de las células del MCI (Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990). Por tanto, se reconoce que la sola presencia de la proteína de *OCT4* no define pluripotencia, ya que los niveles de expresión de éste gen condicionan su capacidad de mantener el estado indiferenciado de las células.

El papel de *OCT4* en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre embrionarias (ES) y su estado no diferenciado, es crucial no sólo en células humanas y murinas, sino también se han llevado a cabo estudios en las especies porcina, bovina y mono Rhesus (Niwa *et al.*, 2000). En el caso de los embriones bovinos, *OCT4* se expresa tanto en el MCI como el TB y este patrón es mantenido hasta el estadio filamentosos tardío en el período de elongación (von Eijk *et al.*, 1999; Degrelle *et al.*, 2005; Keefer *et al.*, 2007), lo cual tiene implicancia para garantizar un fenotipo de intensa proliferación que se observa durante este período de desarrollo (Keefer *et al.*, 2007). Esta expresión se apaga en el trofoectodermo mural durante la etapa más tardía de la elongación (Degrelle *et al.*, 2005).

Por otra parte, *SOX2* (SRY [sex determining region Y]-box 2, según siglas en inglés) (Foygel *et al.*, 2008), es un factor de transcripción que en asociación con *OCT4*, cumple un rol

fundamental en la embriogénesis temprana y en la mantención de la pluripotencia de células madre. En embriones de ratón, *SOX2* tiene una marcada expresión en el MCI, epiblasto y células germinales (Avilion *et al.*, 2003).

En ratones, la expresión de algunos genes asociados con el mantenimiento de la pluripotencia celular, como *FGF4* y *NANOG* es regulada por un enhancer que contiene sitios de respuesta a los factores de transcripción *OCT4* y *SOX2*. Además, este mecanismo también regula la expresión de *OCT4* y *SOX2* mediante una retroalimentación positiva (Masui *et al.*, 2007). *SOX2* es indispensable para mantener la pluripotencia de células madre de ratón, la ausencia de *SOX2* en estas células promueve la diferenciación en células similares al trofoectodermo, lo cual sugiere que la expresión de *OCT4* va a depender de la activación mediada por *SOX2* (Masui *et al.*, 2007). La represión de *SOX2* promueve la expresión de genes marcadores del trofoectodermo lo cual se potencia con la disminución paulatina de los niveles de *OCT4* debido a la ausencia de *SOX2*. Existen evidencias que indican que la función de *SOX2* sobre la activación de los marcadores de pluripotencia, puede ser inicialmente remplazada por otros miembros de la familia Sox. Masui y colaboradores (2007) demostraron que además de *SOX2*, al menos en ratón, *SOX4*, *SOX11* y *SOX15* también pueden actuar sobre este sitio para la regulación de la expresión de los genes antes mencionados. Esto demuestra que aún en ausencia de *SOX2*, en embriones de ratón, es posible activar la expresión de *OCT4* y posiblemente de otros genes como *FGF4* y *NANOG*.

Por otra parte *NANOG*, al igual que *OCT4* y *SOX2*, es un factor de transcripción que mantiene el estado pluripotente de las células embrionarias y las células madre (Foygel *et al.*, 2008). Los patrones de expresión de *OCT4* sugieren a *NANOG* como un inductor “upstream” (Degrelle *et al.*, 2005). Estudios en embriones bovinos producidos por FIV describen que la expresión de *NANOG* aumenta significativamente a partir del día 7 al 17 de desarrollo (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010). Por lo tanto, a diferencia de *OCT4*, la expresión de *NANOG* no es silenciada en las células del trofoectodermo en embriones elongados en la fase más cercana a la implantación, sugiriendo un papel de *NANOG* en los eventos más tardíos del desarrollo peri-implantatorio (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010).

Al igual que los genes mencionados anteriormente, *FGF4* es otro marcador secretado solo por las células del MCI de embriones de ratón y su expresión es regulada por *OCT4* y *SOX2*. Se ha sugerido que en bovinos, la expresión continua de *OCT4* en células TB es esencial para estimular la auto renovación celular de las células del trofoblasto que median

la expresión de *FGF4*, lo que permite la elongación y previene la diferenciación prematura del trofoblasto (Degrelle *et al.*, 2005; Hue *et al.*, 2007).

La segunda diferenciación del MCI para dar lugar al epiblasto e hipoblasto (endodermo primitivo), ocurre durante la etapa de elongación y está dirigido por la expresión de los factores de pluripotencia. En ratones, *NANOG*, *SOX2* y *OCT4* se mantienen en el epiblasto mientras que el hipoblasto se caracteriza por la expresión de *GATA4*, *GATA6*, *SOX17* y *SOX7* (Guo *et al.*, 2010).

En bovinos, es posible detectar la presencia del ARNm de *OCT4* en el trofoblasto de blastocistos mediante hibridación *in situ* y RT-PCR. Una diferencia con lo que ocurre en ratón es la presencia de *FGF4* en el trofoectodermo de blastocistos bovinos en la etapa esférica, lo que en ratones se limita al MCI (Rappolee *et al.*, 1994). La presencia de *OCT4* y *NANOG* en el trofoblasto de embriones bovinos sugiere que su expresión contribuye activamente al mantenimiento de un fenotipo del trofoblasto “no diferenciado”, lo que es compatible con la activa multiplicación celular en el inicio de la elongación (Degrelle *et al.*, 2005). Los niveles de expresión tanto de *OCT4* como de *NANOG* favorecen un fenotipo de lenta diferenciación en el trofoblasto bovino, ya que la expresión de estos genes no interfiere con la expresión de genes trofoblásticos específicos en las primeras etapas de la elongación (Degrelle *et al.*, 2005). Los factores de transcripción que favorecen la diferenciación del trofoblasto y la formación de la placenta, como es el caso de *Hand1* o *Ets2*, se expresan principalmente inmediatamente después de la implantación en ratón, a diferencia del embrión bovino que expresa estos marcadores principalmente en etapas posteriores a la elongación, ya en tejidos extra-embriónicos (Degrelle *et al.*, 2005).

Genes relacionados con la determinación celular y funcionalidad del trofoblasto

En ratones, la mantención y especificación del trofoblasto son mecanismos regulados a través de la acción de factores de transcripción tales como *CDX2* y *TEAD4*. *CDX2* especifica el destino del trofoblasto y restringe la expresión de *OCT4* a las células del MCI (Niwa *et al.*, 2005; Strumpf *et al.*, 2005; Rossant y Tam, 2009). De forma similar a lo que ocurre en ratón, en embriones bovinos, *CDX2* es detectado en células del TB pero no en células del MCI y su función es la especificación del trofoblasto versus células del MCI, sin embargo no es suficiente para inhibir la expresión de *OCT4* en el trofoblasto bovino (Kuijk *et al.*, 2008).

Además de *CDX2*, existen otros factores involucrados en la proliferación del epiblasto/MCI, uno de ellos es *EOMES* Sodermin (*EOMES*), que controla la interacción entre las células del

trofoectodermo polar y mural. Por otra parte, ELF5, el cual participa en la decisión de cuál, el ectodermo extraembrionario (ExE) o el cono ectoplacentario (EPC), será formado a partir del linaje polar (Chen *et al.*, 2010).

El trofoblasto juega un papel fundamental durante el final del desarrollo embrionario temprano regulando la señalización embrio-materna. En este sentido, el trofoblasto expresa genes fundamentales para llevar a cabo esta comunicación. En bovinos, una de las primeras señales emitidas por el TB es el interferón tau (INF τ o *TP1*), el cual es expresado por la población de células mononucleares, siendo estas la mayor contribución del trofoblasto a la placenta. Las células gigantes representan el 20% de las células del trofoectodermica, migran a través de las uniones feto-maternas y se fusionan con las células del epitelio uterino. Estas células gigantes producen proteínas relacionadas con la gestación como glicoproteínas, lactógeno placentario y proteínas relacionadas con la prolactina (Klisch *et al.*, 1999).

Es necesaria una apropiada comunicación y regulación recíproca entre el embrión y los compartimentos maternos para que se produzca una adecuada implantación. Este diálogo es inicialmente mediado por factores solubles, que son producidos y secretados tanto por la madre, como por el embrión. En rumiantes, se han descrito complejas interacciones materno-embriónicas las cuales implican cambios en la expresión génica, existiendo acciones coordinadas entre progesterona, INF τ y prostaglandinas. El resultado de estos cambios en las secreciones del endometrio son responsables de la elongación del embrión mediante efectos sobre la proliferación del trofoectodermo, migración y finalmente sobre la implantación (Dorniak *et al.*, 2013).

La expresión de *TP1* es detectada durante la formación del blastocelo y continúa hasta la implantación en los días 25-28 de gestación. Actúa de manera paracrina sobre el endometrio inhibiendo la liberación pulsátil de PGF $_{2\alpha}$, asegurando la producción continua de progesterona por el cuerpo lúteo (Thatcher *et al.*, 1989). Además, *TP1* estimula la transcripción de una serie de genes y la actividad de varias enzimas de manera específica en el endometrio, las cuales están implicadas en el establecimiento de la receptividad uterina (Hansen *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2007). Por otra parte, el endometrio secreta una sustancia denominada histotrofo, el cual se forma a partir de la secreción de sustancias del epitelio endometrial y glandular, conformado principalmente de proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares e iones (Bazer, 1975; Gray *et al.*, 2001). El histotrofo tiene efectos sobre la proliferación y migración del trofoectodermo y sobre la adhesión al epitelio luminal

del endometrio, regulando también la elongación del embrión (Spencer *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2010).

Klein y colaboradores (2006) llevaron a cabo un estudio de transcriptómica de los genes que se encienden durante el período peri-implantatorio en endometrios de vacas de 18 días de gestación. De esta forma encontraron 87 genes que se encienden en el endometrio de una vaca gestante versus un control no gestante, usando un modelo de gemelos homocigóticos para evitar la variabilidad genética. Estos genes identificados se encuentran involucrados por lo menos en cinco procesos de la interacción entre el embrión y el ambiente materno (Klein *et al.*, 2006).

Mediante un estudio de inactivación de genes en ratones, se han identificado dos genes que son esenciales para la diferenciación del trofoblasto: MASH2 (factor de transcripción miembro de la familia *achaete-scute*) (Guillemot *et al.*, 1995) y HAND1 (factor de transcripción) (Cross *et al.*, 2005). Estos genes tienen una función opuesta durante el desarrollo del trofoblasto donde MASH2 estimula la proliferación celular e inhibe la progresión del trofoblasto a una forma terminalmente diferenciada de las células gigantes, mientras que HAND1 provoca la formación de las células gigantes (Rossant *et al.*, 1998; Riley *et al.*, 1998). En bovinos, MASH2 es expresado específicamente en la placenta pero en mayor abundancia durante la proliferación del trofoectodermo antes de la implantación (Arnold *et al.*, 2006). HAND1 no es detectado en embriones bovinos hasta el estadio ovoide (12 días de desarrollo), lo cual coincide con la diferenciación del trofoectodermo antes de la implantación (Degrelle *et al.*, 2005).

Por otra parte, existe otra familia de proteínas secretadas por el trofoblasto denominadas proteínas asociadas a la preñez (PAG), las cuales son expresadas en las células gigantes del trofoblasto (TGC). Estas proteínas son expresadas más tardíamente, alrededor de los días de la implantación (Arnold *et al.*, 2006). Otras proteínas secretadas por el embrión cuya expresión aumenta a medida que el embrión se elonga son: prostaglandina sintetasa (PGHS-2) e inhibidores de proteasas de la familia TKDP (Charpigny *et al.*, 1997; MacLean *et al.*, 2003).

Biotechnologías reproductivas

Las biotecnologías reproductivas son un conjunto de técnicas que han sido ampliamente utilizadas en animales domésticos, animales de experimentación (ratones) y en humanos. Los objetivos de la utilización de estas tecnologías varían entre especies, por ejemplo en ratón, se utilizan como una herramienta de investigación, incluyendo la producción de

animales modificados genéticamente, producción de ratones “knock out” y como herramienta en el análisis de expresión génica. En humanos, se utilizan principalmente para encontrar soluciones a problemas de infertilidad. En las especies domésticas, los objetivos van desde aumentar la productividad, eliminar enfermedades, mejorar la salud en los rebaños hasta la generación de modelos experimentales para investigación. A partir de esto surgen las técnicas de inseminación artificial y transferencia de embriones, dentro de estas encontramos la producción *in vivo* e *in vitro* de embriones, criopreservación de ovocitos y embriones y clonación por bipartición embrionaria y por transferencia nuclear somática, entre otras.

Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) fue la primera biotecnología reproductiva desarrollada, la cual consiste en coleccionar semen de un macho para posteriormente depositarlo en el tracto reproductor de la hembra mediante instrumental especializado. El procedimiento estándar de la IA incluye la colección de semen, congelación y descongelación del semen e inseminación a hembras sincronizadas. Dependiendo de la especie, se utilizan distintos métodos de inseminación, como la inseminación vaginal, cervical, transcervical e intrauterina (Herman et al., 1994). Las principales ventajas de esta técnica son el mejoramiento genético, el control de enfermedades de transmisión sexual, control de las inseminaciones a través de sistemas de registro, además permite inseminar un alto número de hembras en comparación a la monta natural, ya que es posible la criopreservación del semen y control del sexo de la progenie a través del uso de semen sexado (Herman *et al.*, 1994). Por otra parte, las desventajas son insignificantes con respecto a los beneficios obtenidos. Algunas de las desventajas son que se debe contar con personal calificado y con el equipo de inseminación, y se deben establecer prácticas de manejo para identificar a las hembras en estro (Foote, 1975).

Transferencia de embriones

- Producción *in vivo* de embriones

La producción *in vivo* de embriones surge a partir de la posibilidad de generar múltiples ovulaciones en la hembra mediante estimulación hormonal. Esta permite obtener una elevada tasa de ovocitos y por ende es posible maximizar el número de embriones que posteriormente serán recuperados y transferidos a hembras receptoras (transferencia inmediata o transferencia diferida en caso de los embriones criopreservados). Todas estas

técnicas fueron agrupadas bajo el término “MOET” (“Multiple Ovulation and Embryo Transfer”) por Nicholas y Smith en 1983.

- *Producción in vitro de embriones*

Las técnicas de manipulación *in vitro*, tanto de gametos como de embriones, han adquirido gran importancia en los últimos años. Dentro de los animales domésticos, los bovinos representan una especie de interés para desarrollar estas tecnologías, y además, en varios países, el nacimiento de terneros prueba que estos métodos pueden generar resultados viables (Xu *et al.*, 1987). Para realizar la fertilización *in vitro*, es necesario simular las condiciones que ocurren *in vivo* durante el crecimiento folicular, ovulación y fecundación. Por lo tanto, el ovocito debe madurar a nivel citoplasmático y nuclear (Downs *et al.*, 1989). Los primeros reportes sobre maduración *in vitro* de ovocitos bovinos fueron publicados por Edwards en el año 1965. En el año 1981 nace el primer ternero producido por FIV, de esta forma se comprobó el éxito de la fertilización *in vitro* con ovocitos madurados *in vivo* (Bracket *et al.* 1982). Al principio, el cultivo *in vitro* de ovocitos fecundados presentaba problemas metodológicos con los medios de cultivo utilizados lo que generaba una detención del desarrollo de los embriones producidos, en bovinos esto ocurría en el estadio de 8-16 células. Para superar este inconveniente se realizaron varios experimentos donde se empleaba cultivo *in vivo*, es decir, los cigotos o embriones de dos células eran cultivados en oviductos de oveja (Crister *et al.*, 1986; Eyestone *et al.*, 1987), de coneja (Boland, 1984; Sirad *et al.*, 1985) o de vaquillas (Xu *et al.*, 1987) durante 4-6 días. Este método resultó muy complejo y además había una alta pérdida de embriones en el proceso. Luego surgieron nuevas ideas para superar estos inconvenientes utilizando cultivos celulares, de esta forma los embriones fueron co-cultivados con células y así alcanzaron mejores condiciones de desarrollo.

La producción *in vitro* de embriones se compone de tres fases: 1) maduración *in vitro* de los ovocitos obtenidos de ovarios de vacas faenadas en matadero o por medio de aspiración folicular; 2) fecundación *in vitro* de los ovocitos madurados y 3) cultivo *in vitro* de los embriones.

Los complejos cumulo-ovocito (CCOs) son obtenidos generalmente de ovarios de vacas provenientes de plantas faenadoras o bien a partir de aspiración folicular ecoguiada. De estos ovarios se obtienen ovocitos de diferentes calidades y estadios de maduración. Para la maduración *in vitro* se seleccionan solo los CCOs que posean varias capas de células del cumulus las que deben estar compactas y deben cubrir la totalidad del ovocito y además

estos deben tener un citoplasma oscuro y homogéneo (Leibfried y First, 1979). Los resultados reportados por varios investigadores indican que sólo los CCOs que cuentan con un cumulus completo y compacto tienen la capacidad de completar la maduración *in vitro* (Leibfried y First, 1979) y lograr el estadio de desarrollo esperado.

La fecundación comprende una serie de procesos cuya finalidad es la fusión de los pronúcleos de ambos gametos y la formación del genoma del nuevo individuo. Para ello, es necesaria la realización del co-cultivo de ovocitos y espermatozoides. Los espermatozoides más utilizados para la fertilización *in vitro* son los obtenidos de dosis comerciales congeladas que provienen de bancos de semen. Para realizar la fertilización es necesario separar los espermatozoides vivos de los muertos y además separarlos del diluyente o medio de congelación. Luego de esto los espermatozoides deben ser capacitados *in vitro* para así adquirir la capacidad fecundante (Parrish *et al.*, 1986). Generalmente se utiliza la relación de 1 millón de espermatozoides por mL de medio de fertilización (Gordon, 2003). El éxito de la fecundación depende en gran medida de una adecuada maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos, además de una eficiente capacitación de los espermatozoides (Downs *et al.*, 1989).

Cumplido el tiempo de fertilización (18-21 horas), los ovocitos fertilizados son cultivados por un período entre 6 y 8 días hasta alcanzar el estadio de blastocisto (instancia en la que pueden ser transferidos o congelados). Entre el 20 y el 40% de los ovocitos cultivados logra llegar hasta este estadio de desarrollo (Lonergan y Fair, 2008).

Después de la maduración *in vitro*, entre un 80 y 90% de los ovocitos inmaduros puestos a madurar, alcanzan la metafase II y liberan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de maduración. De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, llegando hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto o blastocisto expandido luego del cultivo *in vitro* durante 6-7 días (Blondin *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003). Esto indica que el cultivo embrionario *in vitro*, corresponde al paso más prolongado dentro del proceso de producción *in vitro*, es el período en el que se generan los mayores porcentajes de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define la calidad de los embriones generados (Rizos *et al.*, 2002, Galli *et al.*, 2003; Lonergan *et al.*, 2003 y 2004). Independientemente de la técnica utilizada para la producción *in vitro* de embriones y el éxito de estas para la generación de individuos viables, los embriones generados son menos competentes que los embriones generados *in vivo*. La menor capacidad de desarrollo a término de los embriones producidos *in vitro* está asociada

a la respuesta de estos al estrés generado por la técnica en sí y los sistemas de cultivo (Rizos *et al.*, 2002).

Criopreservación de ovocitos y embriones

La criopreservación de ovocitos y embriones surge a partir de la necesidad de poder almacenar los ovocitos y embriones sobrantes obtenidos en procedimientos de producción *in vitro* de embriones. Las primeras investigaciones de criopreservación fueron realizadas por Chang y colaboradores el año 1948 utilizando ovocitos y cigotos de conejo. Posteriormente los protocolos han ido mejorando y ya en el año 1977 se publicaron los primeros nacimientos a partir de ovocitos criopreservados de ratón (Whittingham, 1977). Existen dos estrategias que cumplen los requisitos para una criopreservación exitosa tanto de ovocitos como de embriones, una de ellas es la congelación lenta y la otra es la técnica de vitrificación. Varios estudios han indicado que los resultados de la congelación lenta tienen bajas tasas de sobrevivencia e implantación (Oktay *et al.*, 2006). Por otra parte, el uso de la vitrificación comenzó en el año 1985 por Rall y Fahy y ha sido una técnica ampliamente utilizada hasta la actualidad para la criopreservación de ovocitos y embriones de diferentes especies (Vajta *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2002; Moawad *et al.*, 2013). Independientemente de la metodología utilizada para la criopreservación, la tasa de gestaciones obtenidas a partir de gametos congelados/descongelados y también de embriones, sigue siendo inferior a la obtenida con gametos y embriones frescos (Forman *et al.*, 2012). Este hallazgo sugiere que es necesario seguir mejorando estas técnicas.

Clonación

La clonación es la confección de copias idénticas de algún elemento biológico, en animales se refiere a la obtención de seres genéticamente idénticos. Con el deseo de obtener animales genéticamente idénticos para experimentación o la propagación de genotipos de alto valor, se han desarrollado técnicas de micromanipulación de embriones que pueden generar nacimientos de animales viables (Gurdon *et al.*, 1974; Willadsen, 1986; Wilmut *et al.*, 1997). Existen distintas técnicas para llevar a cabo este procedimiento, dentro de ellas están la clonación por bipartición embrionaria, transferencia de blastómeras y transferencia nuclear somática.

- *Bipartición embrionaria*

La bipartición de embriones bovinos fue reportada por primera vez en el año 1982, donde se realizó la bipartición de blastocistos producidos *in vivo* de 6 y 7 días de desarrollo. A partir de 16 embriones bipartidos, se obtuvieron 14 pares de demi-embriones los cuales una vez transferidos, lograron una tasa de gestación del 64% (Ozil, 1983). En el año 1988, se realizó por primera vez la bipartición de embriones bovinos, pero esta vez producidos *in vitro*. El establecimiento de gestaciones a partir de este experimento comprueba la excelente calidad de los embriones utilizados producidos por fertilización *in vitro* (Goto et al., 1988).

El objetivo principal de los distintos grupos de investigadores era lograr desarrollar una técnica eficaz para producir gemelos idénticos y aumentar la tasa de nacimientos en programas de transferencia de embriones (Willadsen *et al.*, 1981; Ozil, 1982; 1983; Williams *et al.*, 1984). En la mayoría de los casos, la bipartición era realizada posterior a la compactación del embrión, es decir, en estadio de mórula o blastocisto (Skrzyszowska *et al.*, 1997), con un microbisturí de metal o una aguja de vidrio (Mertes y Bondioli, 1985).

El éxito de la producción terneros vivos varía dependiendo de varios factores, tales como la técnica de bipartición (Mertes y Bondioli, 1985), la edad del embrión y el estadio (McEvoy y Sreenan, 1990; Velásquez *et al.*, 2016), la calidad embrionaria (Brem *et al.*, 1984; Velásquez *et al.*, 2016), el método de transferencia a realizar (Takeda *et al.*, 1986), y el estado de la hembra receptora (Bredbacka *et al.*, 1992).

En los demi-embriones resultantes de cada bipartición se observan algunos daños celulares y pérdida de blastómeras. El daño y la pérdida de algunas células podría ser una de las principales razones de la menor tasa de gestaciones posterior a la transferencia de embriones bipartidos (Skrzyszowska *et al.*, 1997). Sin embargo, se desarrollaron métodos alternativos de bipartición con el fin de reducir este daño celular. En embriones de ratón y humanos se realizó eclosión asistida perforando la zona pelúcida antes de la diferenciación celular, posteriormente una vez que eclosionaba la mitad del embrión se formaban dos partes conectadas por un delgado puente celular. Una vez que los demi-embriones con menor daño celular fueron transferidos a hembras receptoras lograron producir gestaciones viables (Malter y Cohen 1987). En general, se considera que mórulas compactas y blastocistos son los estadios más adecuados para realizar la bipartición. La viabilidad de los demi-embriones producidos bordea el 50%, pero ha existido la necesidad de mejorar los protocolos para disminuir la variabilidad en los resultados (Bredbacka *et al.*, 1994; 1995; Hashiyada *et al.*, 2005; Velásquez *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Bredbacka y

colaboradores en 1995, observaron que existía una mayor proporción de células viables en los demi-embryones generados a partir de mórulas compactas comparado con los demi-embryones provenientes de la bipartición de blastocistos (77,6% vs 70% respectivamente). Para mejorar el éxito de la generación de demi-embryones se realizaron experimentos donde incluían la adición o eliminación de químicos en el medio de bipartición. Un ejemplo de ellos fue la eliminación de calcio y magnesio, lo cual disminuiría la adherencia entre las blastómeras, facilitando su separación (Nagashima *et al.*, 1984). Por otra parte, la adición de sacarosa ha resultado en mejores tasas de gestación posterior a la transferencia de demi-embryones bovinos (Suzuki y Shimohira, 1986) y ovinos (Herr *et al.*, 1990). Se ha sugerido que el efecto favorable de la sacarosa es causado por un aumento en la estabilidad de la membrana celular inducida por la deshidratación (Williams *et al.*, 1984). Sin embargo, Szell y Hudson, en 1991 observaron efectos negativos tras adicionar sacarosa al medio de bipartición. Otros estudios han descrito que la utilización de citocalasina B (inhibidor de la polimerización de actina) actuaría aumentando la flexibilidad de las membranas celulares, lo cual podría generar una mejor tolerancia a la bipartición (Bredbacka *et al.*, 1995).

Además, la adhesión de las blastómeras a los micro-instrumentos utilizados para bipartir (micro-bisturí o micro-aguja), o a la placa de bipartición puede resultar en un daño celular adicional durante la posterior manipulación (Bredbacka *et al.*, 1995). Para facilitar la manipulación y posterior bipartición del embrión se ha sugerido realizar pequeñas ranuras en la placa, de esta manera es posible asegurar un corte más simétrico de los embryones (Goto *et al.*, 1988). En el caso de otras especies, se realizaron los primeros experimentos de bipartición generando demi-embryones de cabra a partir de embryones producidos *in vivo* el año 1985 (Tsunoda *et al.*, 1985). Ellos describieron que la calidad que presentaban los embryones antes de la bipartición tenían un efecto significativo en el desarrollo posterior de los demi-embryones *in vitro*. Además, en este estudio se evidenció que al bipartir blastocistos se obtenían mejores resultados de viabilidad que bipartiendo mórulas (75% vs 45% respectivamente).

Independientemente de la sobrevivencia de los embryones después de la bipartición, una de las desventajas de esta técnica de clonación es el bajo número de individuos genéticamente idénticos que se obtiene. Además, el hecho de utilizar un embrión como punto de partida impide conocer a priori el genotipo y por tanto fenotipo del animal que se está clonando. En el mejor de los casos, se puede estimar el genotipo basado en las características de los parentales similar a lo que ocurre si los embryones se produjeran por fecundación.

- *Transferencia de blastómeras (clonación embrionaria)*

Esta técnica se realiza a partir de embriones en sus primeros estadios de desarrollo, cuando estos contienen entre cuatro a 32 células, las cuales son separadas y utilizadas para la transferencia a un ovocito previamente enucleado, luego mediante estimulación eléctrica se induce la fusión celular para dar origen a presuntos cigotos con el material genético de los embriones (Hochedlinger y Jaenisch, 2003). En ratones, se ha demostrado que la sobrevivencia de los embriones clonados a partir de células embrionarias es mayor que en los derivados de células somáticas (Humpherys *et al.*, 2002; Hochedlinger y Jaenisch, 2003), esto podría estar explicado porque las células embrionarias tendrían una mejor capacidad de reprogramarse (Hwang *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque requieren un menor grado de reprogramación nuclear que las células somáticas, presentan una mayor inestabilidad epigenética en cultivos *in vitro*, esto se refleja en una expresión génica aberrada lo que finalmente se traduce en anomalías fetales (Humpherys *et al.*, 2001, 2002). Dependiendo del número de blastómeras del embrión donante se pueden obtener varios embriones clonados, sin embargo el número de crías obtenidas aun es limitado y similar a lo que ocurre con la técnica de bipartición, no es posible conocer las características del individuo que se está clonando.

- *Transferencia nuclear somática (clonación somática)*

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) en mamíferos es una técnica de reproducción asistida usada para producir un animal utilizando el núcleo de una célula somática y un ovocito enucleado como receptor. La principal ventaja de esta técnica con respecto a las mencionadas anteriormente es que se puede clonar un individuo casi de forma indefinida y se puede conocer de antemano el genotipo y fenotipo del individuo a clonar si las células donantes provienen de un individuo adulto.

Esta tecnología posee múltiples aplicaciones, por ejemplo sirve para multiplicar animales de granja con alto valor genético, para estudiar procesos de desarrollo embrionario, para producir animales transgénicos con fines biomédicos, y para la conservación de especies en peligro de extinción, entre otras. La especie bovina es probablemente la especie más utilizada para experimentos de SCNT (Oback y Wells, 2007). Se han publicado resultados exitosos de nacimientos de toros de alto valor genético y vacas con alta producción lechera por medio de esta técnica (Tian *et al.*, 2005; Hoshino *et al.*, 2009). Sin embargo, la SCNT es una técnica con múltiples etapas complejas, que incluyen la maduración *in vitro* de ovocitos, sincronización del ciclo celular de la célula donante de núcleo, enucleación del

ovocito receptor, fusión celular, activación del ovocito fusionado y cultivo *in vitro* de embriones (Akagi *et al.*, 2014). Por este motivo, existen muchos factores que contribuyen al éxito o al fracaso del desarrollo del embrión después de la SCNT.

Es importante señalar que el desarrollo de embriones bovinos *in vitro*, ha presentado dificultades, particularmente aquellos producidos después de la maduración y fertilización de ovocitos *in vitro*. Es difícil determinar si el problema se debe directamente a condiciones sub-óptimas del cultivo, o si se debe a la reducción de la competencia de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro*, fertilizados *in vitro* o generados por clonación. Estos aspectos podrían combinarse y producir embriones con un atraso o detención del desarrollo o presencia de anomalías, lo cual genera una reducida viabilidad.

En el caso de la clonación somática, existe una baja eficiencia de la técnica, lo cual limita sus aplicaciones desde un punto de vista técnico. El porcentaje de éxito de la transferencia nuclear somática es del 1 al 3% en la mayoría de las especies clonadas (Solter, 2000). En bovinos, existen pérdidas de gestación durante el primer trimestre, con una alta tasa de muerte fetal que puede llegar al 60% entre los días 35 y 60 (Galli *et al.*, 2003). Finalmente, sólo el 50% de los terneros nacidos vivos, sobreviven la primera semana de vida debido a problemas metabólicos, malformaciones, infecciones umbilicales, inmadurez pulmonar, afecciones respiratorias, digestivas y cardíacas, entre otros (Heyman, 2007). Esta ineficiencia podría estar atribuida tanto a factores biológicos como técnicos. Dentro de los factores biológicos están: la calidad de los citoplastos y de las células somáticas utilizadas, el estadio del ciclo celular, el tipo de célula donante y la capacidad de estas de ser reprogramadas después de la transferencia nuclear. Dentro de los factores técnicos están los sistemas de cultivo, la enucleación del ovocito, la fusión nuclear y posterior activación. De esto surge la necesidad de estandarizar los sistemas de maduración, capacitación espermática, fertilización *in vitro*, cultivo *in vitro* y clonación de embriones bovinos (Hansen, 2006).

Consecuencias del cultivo *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones implica inevitablemente la generación de un sistema que sea capaz de soportar el desarrollo del embrión, el cual resulta ser un ente delicado, dinámico y muy sensible a cambios en el entorno (McEvoy, 2003). La manipulación de gametos y embriones de animales domésticos, ya sea por manipulación física o cambios en el medio ambiente *in vitro*, ha demostrado tener consecuencias que no habían sido previstas al inicio del uso de las biotecnologías reproductivas (McEvoy, 2003). La principal

causa de la baja eficiencia reproductiva en bovinos es la mortalidad embrionaria temprana (Santos *et al.*, 2004), lo cual se define como el fracaso en la preñez durante el período entre la fertilización y el día 42 de desarrollo (Walsh *et al.*, 2011). Entre las especies de ganado doméstico, los rumiantes han mostrado varios tipos de aberraciones en el desarrollo que son indicativos de desregulaciones en la reprogramación celular o bien alteraciones que responden a cambios epigenéticos generados por el microambiente *in vitro*. Hasta ahora se sabe que el embrión necesita una estricta regulación citoplasmática y molecular además de un microambiente apropiado que cumpla con las necesidades de este.

La producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) en embriones durante el cultivo *in vitro* son perjudiciales para el desarrollo (Rizos *et al.*, 2003). Factores tanto endógenos como exógenos asociados a las condiciones de cultivo pueden aumentar la producción de ROS en los embriones, lo que desencadena procesos apoptóticos (Guerin *et al.*, 2001). También se conoce que el estrés térmico afecta notablemente la maduración ovocitaria y por ende el desarrollo embrionario temprano (Putney *et al.*, 1989). Por otra parte, condiciones de cultivo subóptimas, edad y condición corporal de la vaca donante de ovocitos, también pueden conducir a una mortalidad embrionaria temprana (Goff, 2002; Gordon, 2003). Otra de las consecuencias asociadas al cultivo *in vitro* de embriones es la elección de fuentes de macromoléculas, particularmente el suero fetal bovino (SFB) y albumina sérica bovina (BSA). Estudios han determinado que existen aberraciones asociadas con el uso de SFB en el cultivo, la cual es una práctica generalizada en el área de la embriología de especies domésticas, ya que la adición de este suplemento permite mejorar las tasas de blastocistos (Bavister, 1995; Abe *et al.*, 1999; Ferguson y Leese 1999; Crosier *et al.*, 2000; McEvoy *et al.*, 2001).

La mayor evidencia de esto proviene de estudios realizados en bovinos y ovinos posterior a la transferencia de embriones, los cuales fueron producidos a partir de ovocitos madurados, fertilizados y cultivados *in vitro*, o bien embriones producidos *in vivo* pero cultivados *in vitro* posterior a su colecta (McEvoy, 2003). Además de los cambios detectados en la expresión génica durante el desarrollo temprano, el impacto de las condiciones de cultivo se extiende más allá del estadio de blastocisto, como es en la formación de la placenta, el desarrollo del feto y su vida postnatal. Un ejemplo de esto se refleja en que los niveles de ARNm de IGF-2 en hígado y músculo esquelético de fetos bovinos de 70 días diferían de los niveles detectados en los fetos generados a partir embriones producidos *in vivo* (Blondin *et al.*, 2000). Otro estudio en tejido muscular de fetos bovinos de 222 días de desarrollo, indicaron que existe una desregulación de la expresión del ARNm de miostatina,

la cual fue menor en los fetos derivados de embriones producidos *in vitro* (Crosier *et al.*, 2002). Por otra parte, otro estudio en ovejas evaluó fetos de 125 días los cuales provenían de cigotos cultivados *in vitro* por 5 días y otro grupo de blastocistos generados *in vivo* los cuales fueron inmediatamente transferidos (control). Se demostró que los fetos de embriones cultivados *in vitro* tenían una desregulación en la expresión del gen IGF2R con respecto a los controles, y por ende eran de mayor tamaño (Young *et al.* 2001).

Otro estudio en bovinos de raza Simmental, reporta que los animales producidos *in vitro* tenían un mayor peso al nacimiento que los controles producidos *in vivo*, sin embargo al cumplir 1 año de edad se demostró que tanto los animales generados de embriones producidos *in vitro* como los controles no presentaban diferencias en tamaño y peso adulto, pero si se encontraron diferencias en el tamaño y peso del corazón. Esto evidencia que durante la vida adulta el desarrollo de órganos puede verse alterado como consecuencia de la producción *in vitro* de embriones, lo cual es indicativo de una expresión génica alterada en alguna etapa durante o después de la organogénesis (McEvoy *et al.* 1998). Otro aspecto importante es que en algunos de estos embriones producidos *in vitro*, existe un inadecuado desarrollo de la placenta impidiendo el establecimiento de una correcta comunicación materno-embrionaria (Peterson y McMillan 1999).

Evaluación del desarrollo embrionario

Actualmente, se han desarrollado sistemas para predecir la calidad y competencia embrionaria que garanticen mayores tasas de implantación y desarrollo a término. Las bajas eficiencias alcanzadas destacan la necesidad de establecer nuevos criterios de selección que garanticen una buena calidad y correcto desarrollo embrionario (Brandao *et al.*, 2004). Existen técnicas de evaluación embrionaria no invasivas e invasivas, dentro de las primeras están la evaluación de la morfología, la tasa de primera división, la cinética de desarrollo o “time lapse” y la evaluación del desarrollo embrionario posterior a la eclosión de la zona pelúcida. Dentro de las técnicas invasivas están el conteo celular, tinción de apoptosis y biopsias para análisis de expresión génica.

Evaluación morfológica

Para realizar la evaluación de los embriones, ha sido ampliamente utilizada la evaluación morfológica en estadios de mórula y blastocisto, tanto en especies domésticas como en la especie humana. La caracterización visual es un parámetro no invasivo donde es posible determinar la forma, tamaño, apariencia, simetría e intensidad de color de las células

embrionarias y con estos datos es posible asignar un valor predictivo al éxito de la transferencia embrionaria. Este método ofrece varias ventajas ya que se ha demostrado que algunas características del embrión están relacionadas con su potencial de desarrollo y además no es invasivo y por ende no compromete la viabilidad embrionaria. En bovinos, se realiza generalmente al día 7 de desarrollo y los blastocistos son clasificados en base al sistema de evaluación de embriones de la Sociedad Internacional de Embriones (IETS). La mayoría de los embriones bovinos producidos por tecnologías de reproducción asistida, son evaluados en estadio de blastocisto, pero la morfología por sí sola no es un indicador muy confiable de la capacidad de los embriones para establecer gestaciones después de la transferencia (Pontes *et al*, 2009; Pontes *et al*, 2011; Mamo *et al*, 2011).

A pesar de una buena morfología de los blastocistos producidos *in vitro* sólo la mitad de ellos son capaces de implantarse correctamente después de ser transferidos (Arav, 2001). Sin embargo, actualmente se conoce que embriones con una adecuada morfología presentan una expresión desregulada de genes cruciales para el desarrollo normal (Niwa *et al*, 2000; Boiani *et al*, 2002; Wrenzycki *et al.*, 2005; Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2013). Este hecho indica que el aspecto normal del MCI y el TB no son criterios suficientes para predecir la capacidad de establecer patrones normales de expresión génica que lleven a un desarrollo embrionario a término. Por lo tanto, una expresión génica anormal durante las etapas pre, peri y post-implantatorias de embriones generados *in vitro*, es la responsable de las bajas tasas de preñez y de las múltiples anomalías observadas en el feto (Garry *et al*, 1996.; Zhan *et al.*, 2004). Hoy se conoce que los patrones de expresión génica en embriones bovinos se ven afectados por factores relacionados con las técnicas de producción *in vitro* (Wrenzycki *et al*, 2001; Lonergan *et al*, 2001; Wrenzycki *et al*, 2005).

Tasa de primera división y conteo celular

El momento de la primera división es considerado como un marcador del potencial de desarrollo del embrión y se ha utilizado con éxito en programas de fecundación *in vitro* en humanos para identificar a los embriones de mejor calidad (Lechniak *et al.*, 2008). Además, la primera división ha sido asociada a varios parámetros que pueden afectar el potencial de desarrollo de los embriones, como factores relacionados al medio de cultivo o factores intrínsecos del ovocito, como la madurez del citoplasma o del espermatozoide, la capacidad de estimular la liberación de calcio o anomalías cromosómicas (Sakkas *et al.*, 1998; Lechniak *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que los cigotos humanos y bovinos que logran dividirse poco después de la fecundación tienen mayor potencial para llegar al

estadio de blastocisto que los que se dividen más tarde (Lonergan *et al.*, 1999). Por otra parte, debido a que los embriones pre-implantatorios crecen por la activa división de las blastómeras, se utiliza comúnmente el número total de células (NTC) para evaluar la capacidad de desarrollo *in vitro* de estos (Ushijima *et al.*, 2008). Además del NTC, se realiza la evaluación de la apariencia del blastocisto, la cual considera la formación del MCI, TB, una adecuada cavitación y expansión (Geisert y Malayer, 2002).

Cinética de desarrollo o “time lapse”

Esta tecnología permite la observación continua del desarrollo de los embriones sin ser sacados de la incubadora, es decir el time lapse permite realizar un monitoreo en tiempo real de lo que ocurre con los embriones, generando datos de patrones de división, cambios morfológicos y dinámica de desarrollo embrionario mediante imágenes de los embriones en intervalos preestablecidos (Freour *et al.*, 2012; Kovacs, 2014; Radwan *et al.*, 2014). Posteriormente un software específico une y reconstruye todas las imágenes capturadas lo cual permite tener una visión general de lo que ocurre y así poder seleccionar cuál embrión es el más apto para la transferencia. En el año 1997, Payne y colaboradores fueron los primeros en describir los eventos tempranos del desarrollo embrionario humano a partir de esta técnica. Posteriormente el año 2008, Mio y Meada describen la cinética de desarrollo hasta el estadio de blastocisto, también en embriones humanos.

Evaluación del desarrollo embrionario posterior a la eclosión de la zona pelúcida

En especies de implantación tardía, se han realizado escasos estudios en las etapas posteriores a la formación del blastocisto, período durante el cual se produce el mayor número de pérdidas de gestación antes del reconocimiento materno-fetal, entre los días 8 y 17 (Bertolini *et al.*, 2002; Diskin y Morris, 2008; Alexopoulos y French, 2009; Clemente *et al.*, 2011; Mamo *et al.*, 2011). Con menos frecuencia se utiliza la tasa de preñez post-transferencia embrionaria a hembras receptoras, para evaluar la calidad embrionaria (Machado *et al.*, 2013), ya que este parámetro resulta más costoso y el tiempo de gestación es muy largo. Otra alternativa para la evaluación de las etapas posteriores de desarrollo sin transferir los embriones a una hembra receptora es extender la duración del cultivo *in vitro*, utilizando un sistema que permita el desarrollo post-eclosión de la zona pelúcida (Vejlsted *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2013). Sin embargo, existen pocos estudios realizados en el estadio de elongación, durante la cual el embrión lleva a cabo un complejo desarrollo y es donde inicia una comunicación con el epitelio uterino, con el fin de implantarse y establecer

una gestación (Machado *et al.*, 2013). Una alternativa utilizada por algunos autores para analizar la etapa de elongación es evaluar el desarrollo de embriones día 7 post-transferencia y la posterior recuperación en los días 14 a 16 (Bertolini *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2009; Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010; Clemente *et al.*, 2011). De esta manera, el embrión elongado proporciona importante información sobre las pérdidas embrionarias, y se puede utilizar como un modelo de investigación para evaluar embriones producidos *in vitro* (Machado *et al.*, 2013).

Diagnóstico genético pre-implantatorio mediante biopsia embrionaria

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) a partir de la toma de biopsia, es ampliamente utilizado en la práctica clínica humana para evaluar características genéticas de embriones antes de su transferencia a un útero receptor. El objetivo principal es definir si un embrión se ve afectado por una enfermedad monogénica o si posee alteraciones cromosómicas, lo que impediría la correcta implantación y así limitar los riesgos que subyacen a la transferencia de embriones.

Esta técnica es utilizada principalmente en la especie humana, permite realizar un diagnóstico genético preimplantacional lo que permite detectar anomalías cromosómicas, defectos de un gen y determinar el sexo del embrión en los casos de enfermedades ligadas al sexo (de Vos y Van Steirteghem, 2001). La toma de biopsia es un procedimiento muy invasivo para el embrión, y puede potencialmente comprometer la viabilidad, incluso si el análisis genético revela que no hay problemas (De Vos y Van Steirteghem, 2001). Con respecto al efecto que puede tener la toma de biopsias, existe información publicada contradictoria. Algunos estudios indican que no existe una fuerte correlación entre la viabilidad de los embriones después de una biopsia de cuerpo polar o de blastómeras en embriones humanos (Magli *et al.*, 2004), de ratón (Depypere *et al.*, 1991) o de bovinos (Herr y Reed, 1991), mientras que otros investigadores señalan que existen efectos perjudiciales sobre la competencia de desarrollo de embriones, lo que depende en gran medida del método utilizado (de Vos y Van Steirteghem, 2001. Chatzimeletiou *et al.*, 2005). La posible disminución de la viabilidad sería consecuencia de los daños físicos generados en el embrión, ya que esto podría interferir con el contacto entre blastómeras (Damsky *et al.*, 1983). Hasta el momento, existe un limitado número de reportes sobre los resultados obtenidos de nacimientos provenientes de embriones biopsiados para el diagnóstico genético pre-implantatorio (Liebaers *et al.*, 2010; Desmyttere *et al.*, 2012).

- *Biopsia en etapa de segmentación*

La biopsia en la etapa de segmentación se realiza obteniendo una blastómera de un embrión con al menos 6 blastómeras, para realizar este procedimiento es necesario utilizar un medio de cultivo libre de calcio y magnesio con el fin de disminuir la adhesión célula-célula y así facilitar la eliminación de la blastómera seleccionada. Se describe que este proceso no afecta la formación del blastocisto (Dumoulin *et al.*, 1998), sin embargo existe controversia en esto, ya que estudios en ratones mostraron que un medio libre de calcio causa remodelación del citoesqueleto de las células, afectando la compactación (Pratt *et al.*, 1982; Sefton *et al.*, 1996; Pey *et al.*, 1998). La biopsia se lleva a cabo realizando una abertura en la zona pelúcida de manera mecánica o asistida por láser (Cohen *et al.*, 1990; Feichtinger *et al.*, 1992), siendo este último el más utilizado. Se describe que la pérdida de continuidad de la zona pelúcida podría afectar el desarrollo embrionario posterior, varios estudios demuestran una disminución de la capacidad del embrión de eclosionar de la zona pelúcida (Malter y Cohen, 1989; Schmoll *et al.*, 2003). Otro estudio demuestra que tras comparar la cinética de desarrollo de embriones, los blastocistos obtenidos a partir de embriones biopsiados mostraron un retraso en el proceso de compactación y eclosionaron en una forma diferente, sin experimentar el adelgazamiento de la zona pelúcida, lo cual se tradujo en blastocistos más pequeñas con la zona pelúcida más gruesa (Kirkegaard *et al.*, 2012). A partir de estos hallazgos y a pesar de las controversias generadas, existe una ineficacia del proceso y deterioro potencial del embrión al realizar la biopsia en este estadio.

- *Biopsia de cuerpo polar*

La biopsia de cuerpo polar en ovocitos y/o cigotos resulta ser una alternativa a la biopsia de blastómeras, ya que en algunos países la biopsia del embrión resultaba ser ilegal. Esta técnica es potencialmente menos invasiva que la anterior, ya que implica la eliminación de un producto de desecho de la meiosis. Sin embargo, la aplicación de esta técnica ha sido objeto de debate, siendo utilizada en sólo el 10-15% de todos los procedimientos realizados en Europa en la última década. Hoy en día esta tasa sigue disminuyendo probablemente debido a la cantidad de estudios que destacaban las deficiencias técnicas, económicas, biológicas y clínicas de la biopsia de cuerpo polar. Existen altos índices de falsos positivos y negativos al utilizar este método de biopsia y por otra parte, no es posible detectar anomalías genéticas provenientes del padre (Capalbo *et al.*, 2013).

Además, se han reportado efectos negativos sobre parámetros de calidad, existiendo una alta tasa de lisis de los ovocitos (Montag *et al.*, 2009). Por otra parte, también se han

descrito resultados neonatales comparados con los obtenidos al realizar las biopsias en la etapa de segmentación del embrión (Eldar-Geva *et al.*, 2014). Sin embargo, otro grupo de investigación reportaron mayores tasas de fragmentación, menor calidad embrionaria, mayores tasas de arresto del desarrollo y un menor número total de células en el grupo de embriones que se realizó biopsia de cuerpo polar con respecto al grupo control que fueron biopsiados al día tres de desarrollo (Levin *et al.*, 2012). No obstante, en este estudio no se evaluó el potencial de implantación de los embriones después de las biopsias.

- *Biopsia en estadio de mórula*

Recientemente se ha propuesto realizar la biopsia en estadio de mórula (Zakharova *et al.*, 2014). Sin embargo, aún existen pocos reportes para evaluar la viabilidad de esta técnica y compararla con las anteriormente nombradas. Este tipo de biopsia es técnicamente similar a la biopsia en etapa de segmentación, por lo tanto comparten los mismos inconvenientes (la necesidad de utilizar medios libres de calcio y magnesio). La principal ventaja de realizar la biopsia en esta estadio es que es posible obtener un mayor número de células y así obtener una muestra más representativa (Zakharova *et al.*, 2014).

- *Biopsia en estadio de blastocisto*

La biopsia realizada en estadio de blastocisto fue un importante avance en la reproducción asistida actual. Se reportó por primera vez el año 2004 por de Boer y colaboradores, y los primeros nacimientos fueron publicados por McArthur y colaboradores el año 2005. Hasta ahora existen varios estudios preclínicos y clínicos que reconocen el papel de la biopsia en estadio de blastocisto, por lo que esta técnica en la actualidad está reemplazando gradualmente la toma de biopsias de cuerpo polar y en la etapa de segmentación. La importancia de la biopsia en estadio de blastocisto (específicamente del TE) reside en su mayor potencial técnico y biológico, esto está dado porque existe una menor influencia de errores de procedimiento y menor impacto de mosaicismo en el análisis molecular (Cimadomo *et al.*, 2016). Sin embargo, se requieren altos estándares de cultivo *in vitro* y de criopreservación, ya que esto es un factor limitante para la aplicación generalizada de esta técnica.

Técnicas de evaluación de expresión génica en embriones

Durante el desarrollo pre-implantatorio, se activa el genoma embrionario y la evaluación de la expresión de genes o marcadores importantes para el desarrollo es un método efectivo

para determinar la calidad de dichos embriones. La expresión génica en embriones es un campo en dinámica expansión, que se ha beneficiado del desarrollo de herramientas potentes de la biología molecular moderna aplicadas a las peculiaridades de las muestras biológicas (embriones) que por su pequeño tamaño y reducido número de células representan un reto para los sistemas analíticos. De manera general, las metodologías de estudio de la expresión génica en embriones pueden dividirse en dos grandes ramas, aquellas que estudian la expresión génica a nivel de genes individuales (PCR: reacción en cadena de la polimerasa) y por otra parte, a nivel global, lo que se conoce como microarreglos.

El PCR es la técnica más comúnmente utilizada para el estudio de la expresión de genes individuales. El PCR tradicional o llamado también de tiempo final es cualitativo pues no cuantifica la señal amplificada, mientras que el PCR en tiempo real es cuantitativo. Para el estudio de expresión de genes, se requiere previamente la conversión de los ARN mensajeros a ADN complementarios (ADNc) mediante la reacción de reverso transcripción llevada a cabo por la enzima transcriptasa inversa (RT). El conjunto de estas dos metodologías normalmente se le conoce como RT-PCR, dada la cercanía de términos entre RT y tiempo real (o Real time en inglés) a este PCR se le conoce como qPCR o PCR cuantitativo (Nolan *et al.*, 2006).

Los PCRs cualitativo o cuantitativo son los más empleados para el estudio de la expresión de genes en embriones en diferentes estadios de desarrollo. El PCR es una técnica revolucionaria para la detección de ARN o ADN, sin embargo este ha avanzado desde la detección del producto al final de la reacción (PCR cualitativo) hasta la detección mientras ocurre la reacción (qRT-PCR). El qRT-PCR aporta mayor información sobre la expresión de ciertos genes ya que es mucho más sensible que el PCR tiempo final y permite determinar pequeñas diferencias en los niveles de transcrito de dos muestras diferentes. Los métodos más comunes para la cuantificación mediante qPCR consisten en el uso de tinciones fluorescentes que se intercalan en la hebra de ADN (SYBR Green) y en oligonucleótidos modificados que fluorescen cuando hibridan con el ADN complementario (TaqMan). En embriones, se ha descrito el uso de PCR y qRT-PCR para la detección y cuantificación de genes expresados, a pesar de la limitada cantidad de ARNm y por ende de ADNc que puede obtenerse (Degrelle *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2006; Beyhan *et al.*, 2007).

Por otra parte, el microarreglo se define como una serie de miles de oligonucleótidos de ADN de una secuencia conocida, representado en cantidades picomolares y adheridos a

una superficie sólida (Schena *et al.*, 1995). Los oligonucleótidos por lo general representan una pequeña sección de un gen u otro elemento compuesto por ácidos nucleicos. Estos oligonucleótidos conocidos como “eventos” (features en inglés) son usados como sondas para hibridar con un ADN complementario (ADNc) o un ARN amplificado (aRNA), conocidos como dianas. La hibridación sonda-diana es cuantificada mediante fluorescencia específica y se calcula la abundancia relativa de una secuencia determinada en la diana (Schena *et al.*, 1995). Los primeros arreglos de ADN para detectar genes cuya expresión era modulada por interferón fueron fijados a papel de filtro e hibridados con sondas radiactivas (Kulesh *et al.*, 1987). El primer microarreglo miniaturizado fue descrito en 1995 (Schena *et al.*, 1995) y el primer microarreglo conteniendo un genoma completo de eucariontes (*Saccharomyces cerevisiae*) se publicó en 1997 (Lashkari *et al.*, 1997).

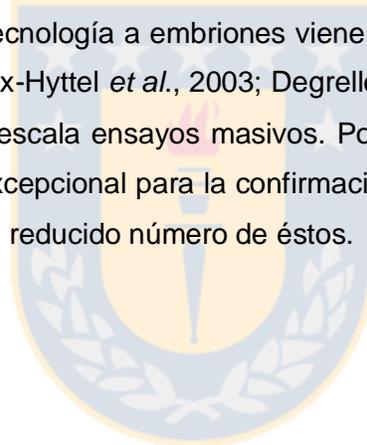
En los microarreglos comunes, los eventos son adheridos a superficies de silicona (se les conoce como Gene chip o Chips de Affymetrix, por la compañía que los introdujo y produce) o a portaobjetos de vidrio. Comercialmente existen innumerables Chips y portaobjetos que representan genomas expresados de distintos tejidos, órganos o células principalmente de ratón y humanos. Un microarreglo puede contener desde 10 sondas o eventos, hasta 2.1 millones (como es el caso de NimbleGen, de la firma Roche). A los primeros se les conoce en ocasiones como macro arreglos (Nuwaysir *et al.*, 2002). A través del uso de microarreglos, se pueden obtener los perfiles de expresión génica de miles de genes de modo simultáneo, así como comparar tratamientos versus controles en las más variadas áreas temáticas (célula infectada vs no infectada; célula tumoral vs no tumoral; arroz resistente a frío vs arroz convencional) y así una larga lista, entre las que se incluyen embriones clonados vs embriones producidos *in vitro* o *in vivo*.

La desventaja del uso de los microarreglos radica en dos factores fundamentales: 1) el pequeño tamaño de las sondas y 2) la reacción cruzada entre especies. En el primer caso pueden no ser detectados genes cuya expresión sí está presente, pero no logran hibridar correctamente la sonda y la diana, dado el pequeño tamaño de la primera. En el segundo caso, si la sonda y la diana no son de la misma especie pueden implicar reconocimientos inespecíficos o también ausencia de reconocimiento (Adjaye *et al.*, 2004). En el caso de la expresión génica a través de microarreglos en embriones, se presenta fundamentalmente el segundo problema debido a que la mayoría de los sistemas comerciales o artesanales incluyen oligonucleótidos murinos o humanos y no específicos de las especies, es por ello que se requiere de réplicas biológicas y técnicas (como cambio de colores de los

fluorocromos sobre un mismo sustrato) para eliminar señales contaminantes o inespecíficas.

Muy ligados a las tecnologías de microarreglos, se han desarrollado las herramientas bioinformáticas que permiten el manejo de mega bases de datos, así como de los programas adecuados para el procesamiento estadístico de los mismos, la adquisición de las imágenes, la normalización de las señales, la eliminación de los ruidos, entre otras. El resultado de un microarreglo debe ser validado de algún modo, lo más común es seleccionar un grupo de genes encontrados en los arreglos y verificar su presencia y cantidad mediante técnicas como el PCR.

Otros métodos de estudios de expresión génica como Northern blot o Western blot, no son aplicables a embriones pre-implantatorios por la escasa cantidad de ARNm presente en éstos. En adición a los métodos descritos, la hibridación in situ es el más efectivo para localizar exactamente el sitio o sitios en los cuales está presente un ARNm en un embrión. La limitación de aplicar esta tecnología a embriones viene dada de nuevo por la pequeña talla de los embriones (Maddox-Hyttel *et al.*, 2003; Degrelle *et al.*, 2005) y también por las dificultades de automatizar a escala ensayos masivos. Por ende la hibridación in situ en embriones se usa de forma excepcional para la confirmación de la expresión de un gen o en el mejor de los casos de un reducido número de éstos.



HIPÓTESIS

La bipartición, de embriones bovinos producidos *in vitro*, en estadio de blastocisto permite la validación de la expresión de marcadores de pluripotencia como predictores de la capacidad de desarrollo embrionario hasta el estadio peri-implantatorio.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el uso de la bipartición de embriones bovinos en el estadio de blastocisto para validar la capacidad predictiva de la expresión de marcadores de pluripotencia sobre el potencial de desarrollo embrionario hasta el estadio peri-implantatorio.

Objetivos específicos

1. Establecer un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro* para la generación de demi-embryones viables.
2. Determinar el efecto inmediato de la bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro* sobre la similitud morfológica y molecular entre parejas de demi-embryones.
3. Determinar el efecto tardío (día 13 de desarrollo) de la bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro* sobre la similitud morfológica y molecular entre parejas de demi-embryones.
4. Evaluar el efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto de embriones producidos por fecundación *in vitro* sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* e *in vivo*.
5. Evaluar el efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto de embriones producidos por fecundación *in vitro* sobre los perfiles de expresión génica global al D17 de desarrollo *in vivo*.
6. Determinar el efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio de embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

Experimento 1. Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos y determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embriones generados.

Incluye los objetivos 1-3. El objetivo de este experimento es determinar si es posible producir demi-embriones con iguales características morfológicas y moleculares, esto significa que un demi-embrión sea el reflejo genético de su contraparte (similar a clones genéticos). De esta forma un demi-embrión sería utilizado en experimentos posteriores para el análisis de expresión génica, mientras que el otro demi-embrión se utiliza para evaluar la competencia de desarrollo posterior (**Figura 1**). La capacidad de desarrollo y similitud entre ambos demi-embriones se evaluará en dos etapas: 1) inmediatamente después de la bipartición (estadio de blastocisto) y 2) al día 13 de desarrollo *in vitro* que corresponde a la etapa peri-implantatoria en embriones bovinos.

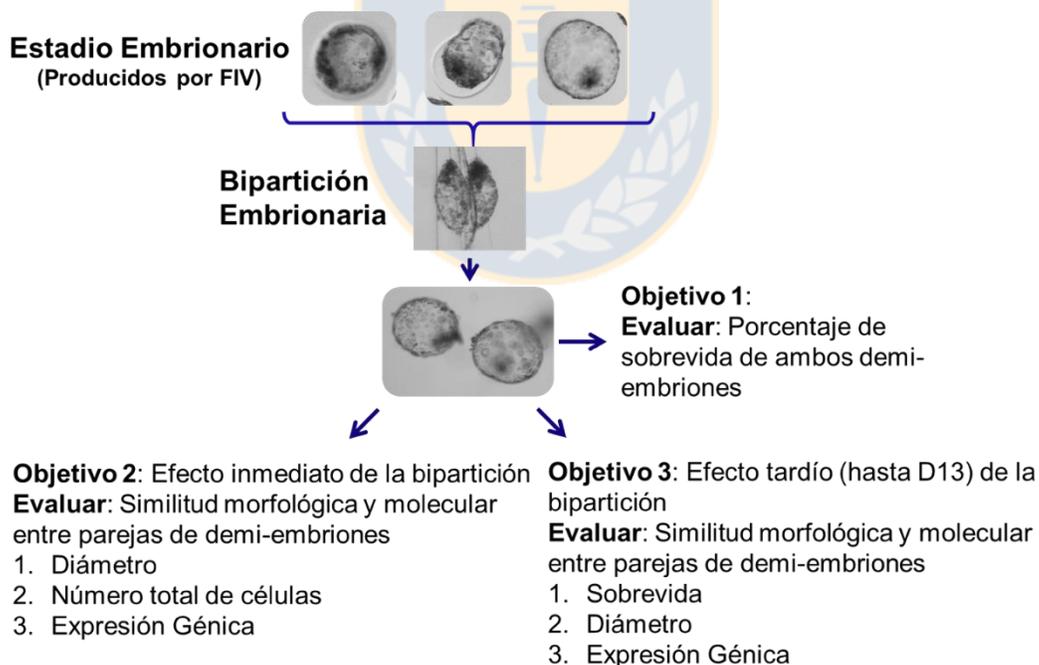


Figura 1. Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos y determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embriones generados. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 1.1: Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro*.

Se produjeron embriones pre-implantatorios por fecundación *in vitro* (FIV), los que fueron bipartidos en estadio de blastocisto, generando dos mitades de demi-embryones, siendo una mitad el reflejo genético de la otra. Con el fin de determinar las condiciones experimentales que producen la mayor tasa de sobrevida embrionaria después de la bipartición, los blastocistos se organizaron en nueve grupos diferentes con respecto a su estadio y día de desarrollo al momento de la bipartición: 1) blastocisto temprano D7; 2) blastocisto expandido D7; 3) blastocisto eclosionado D7; 4) blastocisto temprano D8; 5) blastocisto expandido D8; 6) blastocisto eclosionado D8; 7) blastocisto temprano D9; 8) blastocisto expandido D9 y blastocisto eclosionado D9. La tasa de sobrevida de los dos demi-embryones se analizó 12 h después de la bipartición; y se correlacionó con la etapa de desarrollo del embrión original antes de la bipartición. El objetivo de este experimento fue determinar la edad del embrión (día de desarrollo) y estadio que mostró la tasa de sobrevida más alta y mejor re-expansión *in vitro* después de la bipartición para realizar los experimentos posteriores.

Experimento 1.2: Determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embryones generados después de la bipartición.

En un grupo de demi-embryones se evaluó la similitud entre ambas mitades (en términos morfológicos y moleculares) inmediatamente después de su re-expansión. La evaluación se realizó analizando parámetros morfológicos (adecuada re-expansión, diámetro y número total de células), y moleculares, evaluando la expresión de marcadores relacionados con la pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*), desarrollo trofoblástico (*CDX2* y *TP1*) y apoptosis (*BAX*). Cada demi-embrión fue asignado aleatoriamente al grupo 1 (G1) o al grupo 2 (G2) para su posterior análisis.

Experimento 1.3: Determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embryones generados después de la bipartición al día 13 de desarrollo.

La evaluación tardía al día 13 de desarrollo se realizó analizando parámetros morfológicos (sobrevida y diámetro), y moleculares evaluando la expresión de un marcador de pluripotencia (*OCT4*), desarrollo trofoblástico (*CDX2*, *TKDP1* y *TP1*) y apoptosis (*BAX*). Cada demi-embrión fue asignado aleatoriamente al grupo 1 (G1) o al grupo 2 (G2) para su

posterior análisis. La elección del día 13 de desarrollo fue hecha en base a la experiencia previa donde los blastocistos cultivados *in vitro* logran expandir hasta el día 13 de desarrollo sin adherirse a la placa de cultivo.

Experimento 2. Evaluación del efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* e *in vivo*

Incluye el objetivo 4. El objetivo de este experimento es determinar el efecto de la bipartición sobre el desarrollo embrionario peri-implantatorio. La calidad y competencia de los embriones bipartidos en el estadio de blastocistos se comparó con embriones no bipartidos (controles) en dos etapas: 1) cultivo *in vitro* hasta día 13 de desarrollo y 2) desarrollo *in vivo* hasta el día 17 (**Figura 2**).



Figura 2. Evaluación del efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* e *in vivo*. El cuadro rojo muestra que esos demi-embryones fueron congelados para realizar el experimento 3. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2.1: Evaluar el efecto de la bipartición sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* hasta el día 13 de desarrollo.

Se bipartieron blastocistos y una de las mitades de cada embrión fue congelada para realizar el análisis de expresión génica (objetivo 5) y las otras mitades fueron cultivadas *in vitro* hasta el día 13 de desarrollo (en plástico y en co-cultivo con células endometriales) las cuales se compararon con el grupo control sin bipartir. Diariamente se realizaron mediciones del diámetro de cada embrión y demi-embrión para determinar su tasa de crecimiento y además, una vez cumplidos los 13 días de cultivo *in vitro*, tanto en monocapa de células endometriales como en plástico, se congelaron a -80°C en tubos de 1.5 mL para análisis moleculares de los genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, *TP1*, *EOMES*, *FGF4* y *TKDP1*.

Experimento 2.2: Evaluar el efecto de la bipartición sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vivo* hasta el día 17 de desarrollo.

En este experimento, se evaluó el efecto de la bipartición sobre el desarrollo embrionario durante el período de elongación. Para ello se transfirieron a vacas receptoras previamente sincronizadas embriones derivados de blastocistos bipartidos y controles. En el caso de los embriones bipartidos, después de la re-expansión y una vez comprobada la sobrevivencia de ambas mitades así como la similitud en diámetro, se eligió al azar uno de los demi-embryones para el posterior análisis de expresión génica (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) mientras que su contraparte se utilizó para evaluar la capacidad de su desarrollo *in vivo* hasta estadio de elongación. Los embriones elongados fueron recuperados al día 17 de desarrollo. Se comparó el número de embriones recuperados, la longitud de estos y el nivel de expresión de seis genes (*OCT4*, *SOX2*, *CDX2*, *TP1*, *TKDP1* y *EOMES*) entre ambos grupos. Además, se evaluó el efecto de la bipartición de los embriones elongados a partir de un análisis global de la expresión génica mediante la técnica de microarreglo.

Experimento 3. Determinar el efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio

Incluye el objetivo 5. El objetivo de este experimento es evaluar el papel predictivo de la expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Para este experimento se utilizaron los demi-embryones que fueron congelados a -80°C en el experimento anterior. Para ello, los demi-embryones almacenados se organizaron en cuatro grupos 1) demi-embryones que sus contrapartes fueron cultivadas en plástico hasta el día 13 de desarrollo y 2) demi-embryones que sus contrapartes fueron cultivadas en monocapa de células endometriales hasta el día 13 de desarrollo; ambos grupos fueron divididos a su vez en 3) demi-embryones que sus contrapartes lograron sobrevivir hasta el día 13 de desarrollo y 4) demi-embryones que no lograron sobrevivir hasta el día 13 de desarrollo (**Figura 3**).

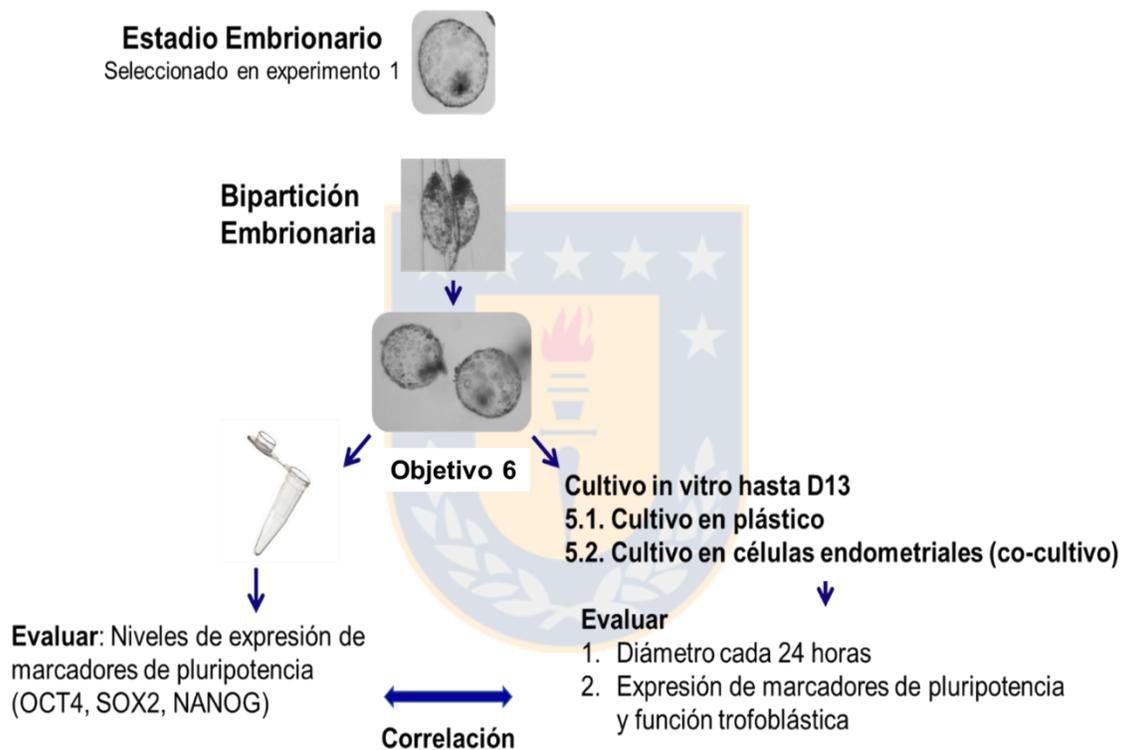


Figura 3. Determinación del efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio. Fuente: Elaboración propia.

Producción de embriones *in vitro*

Salvo que se indique explícitamente, todos los reactivos y medios de cultivo utilizados tanto para el trabajo con células, como con ovocitos y embriones, fueron de la marca Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, Estados Unidos).

Colecta de ovocitos y maduración in vitro (IVM)

Se utilizaron ovocitos obtenidos de ovarios de vacas faenadas en matadero Frigosur (Chillán). Se colectaron aproximadamente 30-40 ovarios por vez, los cuales fueron trasladados inmediatamente al Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción en solución salina al 0,9% suplementada con antibiótico/antimicótico 1x (Hyclone) a una temperatura controlada entre 37° y 39°C. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados con solución salina al 0,9% para eliminar la sangre y evitar posibles contaminaciones durante la punción folicular. Luego se puncionaron los folículos entre 3 y 8 mm con una aguja hipodérmica de 18 G usando una jeringa de 10mL. Una vez realizado este procedimiento, se mantuvo el líquido folicular en tubos de 15 mL en un baño termostático a 38°C hasta el momento de la selección de los ovocitos. Para colectar éstos, se dejó decantar el contenido folicular por 10-15 minutos y luego se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante.

El siguiente paso fue mezclar el sedimento obtenido con medio de manipulación (ver anexo 1). La selección de los complejos cúmulo-ovocitos (CCOs) se realizó bajo estereomicroscopio. Se seleccionaron los ovocitos grado I y II (de Loos et al., 1989), que corresponden a aquellos que presentan un citoplasma homogéneo, oscuro y con más de dos capas compactas de células del cúmulo (no degenerado).

La maduración se realizó en una placa de cuatro pocillos (Nunc, Rochester, NY, USA), usando medio de maduración (ver anexo 2). Se colocaron a madurar entre 25 y 30 CCOs por cada pocillo los cuales fueron incubados durante 21 horas a 39°C, en una atmósfera controlada con 5% de CO₂.

Fecundación in vitro (FIV)

Los ovocitos, luego de experimentar el proceso de maduración *in vitro* por un período de 21 horas, fueron fecundados con semen de un toro con buena fertilidad según experiencia previa de nuestro laboratorio (Velásquez *et al.*, 2016). Los espermatozoides fueron separados a través del paso por un gradiente de Percoll 45%-90% (ver anexo 3) y posterior centrifugación y lavado con medio de capacitación (ver anexo 4) y medio de fecundación (TALP-FIV, ver anexo 5). Para la fecundación se transfirieron entre 25 y 30 CCOs con adecuada expansión de las células del cumulus a cada pocillo de una placa de cuatro pocillos y se incubaron con un millón de espermatozoides/mL de medio de fecundación. Una vez transcurridas las 18 horas de fecundación los presuntos cigotos fueron desnudados en una solución de 0,3 mg/mL de hialuronidasa en medio de manipulación y aplicando

vórtex por tres minutos a temperatura ambiente (TA: 25°C). Posteriormente, se cultivaron durante 7 días hasta estadio de blastocisto, en medio SOFaa (fluido oviductal sintético (ver anexo 6)). La placa de cultivo (Nunc, Rochester, NY, USA), se almacenó en una bolsa hermética sellada con calor la cual fue gasificada con una mezcla de aire que contenía 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂. Finalmente la bolsa con la placa de cultivo fue mantenida en la incubadora a 39°C durante todo el período de cultivo.

Evaluación morfológica de la calidad de los blastocistos antes de la bipartición

La evaluación del desarrollo pre-implantatorio de embriones bovinos generados por fecundación *in vitro* se realizó determinando el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta estadio de blastocisto. Los blastocistos fueron clasificados en grado I y II; GI: excelente calidad, buena expansión, MCI bien definido, sin defectos visibles, las blastómeras son claramente visibles, de color y estructura esferoide uniforme; GII: buena calidad, presencia de pocas blastómeras desprendidas, el MCI posee una pequeña cantidad de detritus celulares y su forma puede ser ligeramente irregular. Sólo los blastocistos grado I fueron utilizados para la bipartición y generación de demi-embryones.

Generación de demi-embryones por bipartición

Para la generación de demi-embryones se utilizaron blastocistos producidos por fecundación *in vitro* calidad I. Para ello, los blastocistos fueron bipartidos perpendicularmente tomando como referencia el MCI. La bipartición se realizó con un microbisturí (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU) en un sistema de micro-gotas con medio TCM199 + 30% SFB bajo un estereomicroscopio. Los demi-embryones generados permanecieron en el sistema de cultivo 12 horas momento al cual se evaluó la tasa de sobrevivencia a través de su capacidad de re-expansión *in vitro*.

Medición del diámetro de los demi-embryones y conteo de número total de células

El diámetro de los demi-embryones se determinó desde el día 10 hasta el día 13 de desarrollo dependiendo del experimento. La medición del diámetro de los demi-embryones se realizó usando el software de la cámara digital 5-Mpx Micrometrics (Arquimed, Santiago de Chile, Chile). Las mediciones fueron realizadas todos los días a la misma hora. Los pares de demi-embryones se consideraron morfológicamente similares cuando sus diámetros tenían diferencias menores a un 20%. El número total de células se analizó solo en embryones de día-10 y para ello se escogieron al azar 20 demi-embryones derivados de 10 blastocistos. Los demi-embryones se incubaron con Hoechst 33342 a una concentración de

5µg/mL por 20 minutos. Los demi-embriones teñidos se colocaron en un portaobjetos y fueron visualizados en un microscopio invertido con fluorescencia (Olympus CKX41, Tokio, Japón). Debido al incremento del número de células a medida que avanza el desarrollo no fue posible determinar el número total de células en embriones de más de 10 días de desarrollo.

Desarrollo embrionario peri-implantatorio *in vitro* (en placa hasta día 13)

Los demi-embriones generados fueron separados en dos grupos para evaluar su continuidad de desarrollo *in vitro*. Uno de ellos se realizó en placas de 4 pocillos en SOFaa considerándose Grupo de plástico mientras que otro grupo de embriones fue cultivado en medio SOFaa en mono-capa de células endometriales y se consideró Grupo de co-cultivo. En ambos grupos, los demi-embriones fueron cultivados de forma individual hasta el día 13 de desarrollo. El desarrollo embrionario fue monitoreado cada 24 horas para comprobar viabilidad y determinar diámetro embrionario.

Para realizar el co-cultivo, se descongelaron células endometriales en fase luteal tardía (disponibles en el Laboratorio de Biotecnología Animal) en un baño termostatado a 38°C, luego se realizó el cultivo de estas células en una placa de 100 mm en medio DMEM-F12 suplementado con 1 mM de glutamina, 0,2 mM de piruvato, 10 ng/mL de EGF (epidermal growth factor) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Una vez logrado el 100% de confluencia, se retiró el medio DMEM-F12 y las células se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, se despegaron las células de la placa añadiendo 1 mL de Trypsin- EDTA 1x, se colectaron en un tubo de 1,5 mL y se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm. El pellet resultante se homogenizó añadiendo 1 mL de medio DMEM-F12 y estas células fueron cultivadas en una placa de 4 pocillos añadiendo 100 µL de la suspensión (equivalente a 200.000 células, generando un 80% de confluencia). Luego se adicionaron 500µL de medio SOF en cada pocillo y se colocaron los demi-embriones, los cuales se incubaron a 38,5°C en 5% de CO₂.

Transferencia de embriones a hembras receptoras sincronizadas

La sincronización de las hembras receptoras se realizó a través del uso de dispositivos intravaginales de progestágeno sintético (1,38 gramos por esponja CIDR; EAZI-Breed™, InterAg, Hamilton, NZ) por 7 días, luego del retiro del dispositivo, se realizó la administración intramuscular de 2 mL por animal, equivalente a 0,5 mg de una prostaglandina sintética análoga, estructuralmente relacionada a la PGF_{2α}. Las vacas presentaron celo entre 24-48 horas después del retiro del dispositivo intravaginal. Posteriormente, se administró

intramuscularmente a cada animal 5 mL de un análogo sintético del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) Conceptal[®], equivalente a 0,02 mg del principio activo (buserelina). Al cabo de 24 horas se produjo el proceso de ovulación. Para corroborar esto, se realizaron exámenes ecográficos seriados de cada animal, para determinar el éxito del protocolo de sincronización.

Para el grupo control, se seleccionaron 20 blastocistos calidad I (expandido con clara formación de MCI) para realizar la transferencia a las vacas receptoras (se utilizaron 5 hembras bovinas). Los embriones se transportaron en grupos de 4 blastocistos por pajuela de transferencia en medio holding comercial a 37°C, los cuales fueron transferidos de forma no quirúrgica en el cuerno ipsilateral del ovario ovulado (cuatro embriones por receptora).

Para el grupo de embriones bipartidos, se seleccionaron 20 demi-embryones para la transferencia (las 20 contrapartes fueron congeladas individualmente a -80°C para realizar los análisis de expresión génica). Para realizar la transferencia a las vacas receptoras se utilizaron cinco hembras bovinas previamente sincronizadas. Los demi-embryones se transportaron en grupos de cuatro por pajuela de transferencia en medio holding comercial a 37°C, los cuales fueron transferidos de forma no quirúrgica en el cuerno ipsilateral del ovario ovulado (4 demi-embryones por vaca receptora).

Las hembras receptoras (n=10) se mantuvieron en instalaciones del área de Reproducción Animal de la Universidad de Concepción, Campus Chillán con condiciones de alimentación controlada.

Recuperación y evaluación de embriones en estadio peri-implantatorio (elongados)

Los embriones se colectaron al día 17 de desarrollo y se evaluó tasa de recuperación, tasa de elongación (o estadio de desarrollo) y expresión génica. Para esto, las vacas receptoras fueron llevadas a la planta faenadora Frigosur (Chillán) y se recuperaron los úteros, los cuales fueron transportados a 4°C hasta el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Concepción, Campus Chillán. Para la colecta se realizó en primer lugar, un lavado del tracto reproductivo (para retirar restos de sangre) con solución salina estéril y posteriormente se procedió a cortar y eliminar restos de tejido circundantes a los cuernos uterinos. Posteriormente, se lavó el interior de cada cuerno en dirección craneal (cérvix-oviducto) con solución salina a 38,5°C suplementada con 2% de suero fetal bovino, colectando el líquido de lavado en tubos de 50 mL, el cual se dejó decantar y una vez

eliminado el sobrenadante se visualizó el sedimento en placas de 100 mm con un estereomicroscopio.

Se comparó la tasa de recuperación y la longitud de los embriones provenientes de blastocistos bipartidos y de blastocistos controles. Para esto se utilizaron un total de 10 embriones elongados en estadio filamentososo que superaban los 10 mm de longitud, esto para disminuir la variabilidad en la expresión génica que puede existir con respecto al tamaño de los embriones. Una vez evaluados los embriones, se congelaron individualmente a -80°C en tubos de 1,5 mL para el posterior estudio de expresión de los genes por qPCR (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, *TP1*, *EOMES*, *FGF4* y *TKDP1*). Además, se evaluó el efecto de la bipartición de los embriones elongados a partir de un análisis global de la expresión génica mediante la técnica de microarreglo.

Evaluación molecular de la calidad de los embriones en estadios pre y peri-implantatorios

Obtención de ARN

Para la obtención de ARN de las muestras previamente congeladas a -80°C de blastocistos controles y bipartidos (demi-embriones), se utilizó el kit Cells-to-cDNA™ II (Ambion®). Los embriones de cada grupo fueron lavados previamente con solución de PBS 1x a 4°C , luego se añadieron 50 μL de buffer de lisis II y se incubaron durante 10 minutos a 75°C . Posteriormente, se realizó el tratamiento con 1 μL de DNAsa I (concentración final de 0.04 U/ μL), luego se centrifugó cada muestra y fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C . Finalmente, para inactivar la DNAsa I, se incubaron las muestras a 75°C por 5 minutos. Luego de esto, los ARN se almacenarán a -80°C , hasta su conversión a ADNc.

Transcripción reversa

Para la obtención de ADNc, se utilizó el kit SuperScript® III First-Strand. La elusión se realizó en un volumen final de 20 μL (no se realizó cuantificación ni análisis del RNA debido a la baja cantidad de ácidos nucleicos que se obtiene a partir de estos embriones). Para esto, se usaron 7 μL de ARN de cada muestra, 1 μL de Random Hexámeros y 1 μL de Buffer annealing, los cuales fueron incubados durante 5 minutos a 65°C , posteriormente, se adicionaron 10 μL de 2x First-Strand Reaction Mix y 2 μL de Enzima SuperScript® III/RNaseOUT™, y se incubaron nuevamente a 25°C por 10 minutos, luego 50°C por 50 minutos y finalmente, 85°C por 5 minutos. Los ADNc obtenidos a partir de lo realizado anteriormente, se mantuvieron congelados a -20°C hasta su uso.

Estudio cuantitativo por qPCR de genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano

Para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes incluidos en este trabajo (excepto genes para validación de microarreglo), se utilizó el método de curva estándar. Como estándar para la cuantificación por PCR a tiempo real, se utilizó la banda extraída desde el gel de agarosa del producto obtenido previamente. La extracción desde el gel de agarosa se realizó siguiendo las instrucciones del Kit E.Z.N.A.[®] Gel Extraction. Posteriormente se determinó la concentración del producto obtenido utilizando 2 μ L de éste, en el espectrofotómetro para micro-placas Epoch[™] de BioTek.

La curva estándar se realizó con al menos 8 diluciones seriadas (1:10) del producto de PCR de cada gen, las que se utilizaron en duplicado para cada punto de la curva. Para el análisis de la curva estándar y las muestras, se realizó la reacción de PCR con el kit SensiMix[™] SYBR Hi-ROX (Bioline) en un volumen final de 10 μ L (mezcla: 5 μ L de Sensimix 5x, 2,5 μ L de agua estéril libre de nucleasas, 10 pmoles de cada partidor y 2 μ L de ADNc). Los partidores fueron diseñados utilizando el programa PrimerQuestSM (IDT, USA), a partir de las secuencias publicadas para cada gen en NCBI (**Tabla 1**). Se realizaron dos réplicas de cada muestra por cada gen, las cuales fueron consideradas como réplicas técnicas. Además en cada reacción de PCR se incluyó un control negativo en el cual se reemplazó el templado (ADNc) por agua estéril libre de nucleasas. Las reacciones fueron corridas en el equipo Stratagene-Mx3000P[™] PCR en Tiempo Real (Stratagene, E.E.U.U.). El “crossing point” (CP) fue calculado por el software apropiado incorporado en el equipo. Se utilizó β -actina (ACTB) como gen de referencia y se normalizaron los CP para determinar las diferencias en los niveles de expresión entre las muestras estudiadas. La normalización se realizó utilizando los niveles de expresión de ACTB como cociente de los valores obtenidos para cada gen.

Tabla 1. Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real.

Gen	Secuencia de partidores	TA (°C)	Tamaño (pb)	Identificador NCBI
<i>OCT4</i>	F: 5´ - GGAGAGCATGTTCTGCAGTGC 3´ R: 5´ - ACACTCGGACCACGTCCTTCTC 3´	58	95	NM_174580
<i>SOX2</i>	F: 5´ -CGAGTGGAAACTTTTGTCCG 3´ R: 5´ -GGTATTTATAATCCGGGTGTT 3´	55	101	NM_001105463
<i>NANOG</i>	F: 5´ - TTCCCTCCTCCATGGATCTG 3´ R: 5´ - ATTTGCTGGAGACTGAGGTA 3´	58	219	NM_001025344
<i>TP1</i>	F: 5´ - GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA 3´ R: 5´ - CATCTTAGTCAGCGAGAGTC 3´	58	584	XM_871285
<i>EOMES</i>	F: 5´ - GCAGAGGCTCTTATCAGA 3´ R: 5´ - GCGTTAATGTCCTCACACTT 3´	55	256	XM_001251929
<i>CDX2</i>	F: 5´ - CCTGTGCGAGTGGATGCGGAAG 3´ R: 5´ - CCTTTGCTCTGCGGTTCT 3´	58	230	XM_871005
<i>FGF4</i>	F: 5´ - TGCGGAGGCTGTACTGCAAC 3´ R: 5´ - TCTCTGAACCTGCACTCGTCG 3´	58	229	NM_001040605
<i>TKDP1</i>	F: 5´ - TGGCTGTGAAGGAAATGGAAAC 3´ R: 5´ - CACGTTGACCAATGGAGGAAAG 3´	55	243	AF241776
<i>BAX</i>	F: 5´ -AGGGTTTCATCCAGGATCGAGC 3´ R: 5´ - TCATCTCCGATGCGCTTCAGAC 3´	58	124	NM_001191220.1
<i>ACTB</i>	F: 5´ - GGCCAACCGTGAGAAGATGACC 3´ R: 5´ - GAGGCATACAGGGACAGCACAG 3´	58	96	BT030480.1

TA: temperatura de alineamiento. Fuente: Elaboración propia.

Estudio de la expresión génica por microarreglo en embriones peri-implantatorios (embriones elongados controles y elongados bipartidos).

Para el análisis global de expresión génica en estadio peri-implantatorio, se realizó un “screening” a través de la técnica de microarreglo, con el fin de determinar las diferencias que existen entre embriones elongados provenientes de blastocistos controles y bipartidos, producidos por fecundación *in vitro*. Se analizó la expresión por microarreglo de un total de 10 embriones elongados en estadio filamentosos que superaban los 100 mm de longitud, (5 embriones elongados provenientes de blastocistos controles y 5 embriones elongados provenientes de blastocistos bipartidos). Se determinó el porcentaje del total de genes expresados, además del porcentaje de genes sobre-expresados, sub-expresados e igualmente expresados.

Extracción del ARNm y síntesis del ARNc

Para el aislamiento del ARN de los embriones elongados D17 se utilizó el kit E.Z.N.A.[®] total RNA (Omega Biotek, Santiago, Chile) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se midió utilizando el espectrofotómetro Epoch™ (Biotek, Bad Friedrichshall, Alemania). Luego se realizó una evaluación de la integridad de los ARN producidos. Para esto, se usó 1µL de ARN de cada muestra el cual fue mezclado con 4µL de “R6K sample buffer” (Agilent), los que fueron incubados tres minutos a 72°C y 2 minutos a 4°C, luego de esto, fueron leídos por el equipo 2200 TapeStation (Agilent Technologies EE.UU), el cual es una estación de control y calidad de ácidos nucleicos automático. Los resultados fueron analizados por el 2200 TapeStation Software (Agilent Technologies EE.UU). Para el análisis de microarreglo se seleccionaron las muestras con un valor de RIN > 8,5. El marcaje de las muestras se realizó siguiendo las instrucciones del Kit Agilent RNA Spike-In. Se utilizaron fibroblastos bovinos como referencia del microarreglo, los cuales fueron marcados en verde con cyanine-5. Los embriones elongados (controles y bipartidos) se marcaron en rojo con cyanine-3. Para cada muestra se usaron 100 ng de ARN total.

La producción ARNc y su amplificación, se realizó siguiendo las instrucciones del Kit Low Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies EE.UU). Posteriormente, para la purificación del ARNc, se utilizó el kit E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I (Omega Biotek, Santiago, Chile). Posteriormente, los ARNc fueron purificados usando el kit E.Z.N.A.[®] total RNA según

las instrucciones del fabricante y se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro Epoch™ (Biotek, Bad Friedrichshall, Alemania).

Hibridación, lavado y escáner de los microarreglos

Una vez obtenidos los ARNc, se realizaron las hibridaciones, para ello se utilizó el “slide Bovine (V2) Gene Expression Microarray, 4x44K” (Agilent Technologies EE.UU). El slide está compuesto por 4 bloques de 43,803 eventos, lo que se traduce en 43.803 fragmentos de genes.

Posteriormente se prepararon los mix de hibridación usando el kit Hi-RPM Gene Expression Hybridization (Agilent Technologies, EE.UU). De acuerdo al protocolo de Agilent para el Microarreglo 4 x 44 K, se utilizaron 825 ng de cada ARNc. Las muestras de ARNc marcados con Cy-3 y Cy-5 fueron mezclados, hibridizados y añadidos al slide del microarreglo. Posteriormente la cámara y el slide fueron ensamblados y colocados en el horno para la hibridación, girando a 10 rpm a 65°C por 17 horas. Transcurrido este tiempo, los slides fueron lavados usando el kit Gene Expression Wash Buffer (solución de lavado 1 y solución de lavado 2, ambas con 0,005% de Triton X-102).

Finalmente, para determinar la intensidad de la fluorescencia de cada spot, se realizó la lectura del slide en el equipo SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies EE.UU). Una vez obtenidas las imágenes, los datos fueron extraídos con el programa Agilent Feature Extraction v.10.5.1.1. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa GeneSpring 12.5 (Agilent Technologies E.E.U.U.). Para determinar los genes diferencialmente expresados se utilizó como análisis estadístico la prueba de t considerando un valor de fold change >2.0 y un valor de $p \leq 0,05$. Se consideró una expresión diferencial de los genes cuando el logaritmo en base dos de la proporción de las medianas fue mayor que 2 y menor que -2. Se consideró que los genes estaban igualmente expresados, cuando el logaritmo en base dos de la proporción de las medianas se encontraban entre los valores mencionados.

Análisis de datos

Para determinar los genes que fueron diferencialmente expresados entre ambos grupos de embriones, los datos obtenidos fueron analizados usando el software GeneSpring 12.5 (Agilent Technologies, USA). Los genes fueron considerados diferencialmente expresados con un valor de fold change >2. Para establecer diferencias estadísticamente significativas,

el análisis estadístico se realizó usando una prueba t no pareada y un valor de fold change >2 con un valor de $p \leq 0,05$.

Análisis de ontología de genes y vías de interacción de los genes diferencialmente expresados

Los análisis de ontología de genes (GO) y vías de interacción se realizaron usando el software GeneSpring 12.5 (Agilent Technologies, USA). Esto se realizó en base a la lista de los 383 genes diferencialmente expresados que presentaban un valor de fold change >2. Para el análisis de ontología de genes se consideró un valor corregido de $p=0.58$ (el cual es el valor mínimo para detectar GO terms). Para el análisis de vías de interacción se utilizó la base de datos WikiPathways.

Con el software GeneSpring se detectaron las posibles conexiones entre los genes seleccionados y fueron clasificados de acuerdo con los valores de P y número de entidades que coincidían por vía. Del total de genes diferencialmente expresados con un valor de fold change ≥ 2.0 , la red de interacción génica fue creada con el programa GeneMania Prediction Server (Warde-Farley *et al.* 2010).

Validación del microarreglo mediante análisis de qRT-PCR

Luego de realizar el análisis de expresión por microarreglo, del total de genes diferencialmente expresados, se seleccionaron 10 genes para la validación de los datos obtenidos, 9 de ellos se encontraban diferencialmente expresados entre ambos grupos, 4 genes sobre-expresados (*GRK5*, *GATSL2*, *CAMKMT* y *PLXDC1*) y 5 genes sub-expresados (*PRSS35*, *NR4A1*, *TFPI2*, *SLC18A2* y *SH3BGRL*) en los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos con respecto a los controles y finalmente un gen igualmente expresado (*CDX2*). Para esto, se realizó mediante qPCR la cuantificación de los valores de expresión de los genes seleccionados de cada muestra utilizada para la hibridación.

El ARN purificado fue tratado con 1U de DNAsa I (Invitrogen, Carlsbead, CA) para la eliminación de ADN genómico en un volumen de reacción de 10 μL e incubada por 30 minutos a 37°C. La DNAsa fue inactivada a 65°C por 10 min en presencia de 25 mM EDTA (1 μl). El ARNm fue convertido a ADNc utilizando la enzima Reverso Transcriptasa M-MLV (Invitrogen, Carlsbead, CA), según instrucciones del fabricante. Se utilizó el volumen total del tratamiento con DNAsa I (10 μL) en una reacción final de 20 μL que contenía 150ng/ μL de random primers, 10 mM de cada dNTP, 4 μL de 5 \times first strand buffer, 0,1M de DTT, 1 μl

de inhibidor de ribonucleasas RNaseOUT™ (40 unidades/μL) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 200U/μL de la enzima M-MLV RT, los parámetros de incubación fueron 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y finalmente 70°C por 15 min. Los ADNc producidos se mantuvieron congelados a -20°C hasta su uso en los experimentos de q-RT-PCR.

El análisis se realizó usando el método $\Delta\Delta C_t$ y para cada qRT-PCR, las muestras fueron analizadas en duplicado (réplicas técnicas). Las secuencias de partidores, nombres de los genes, temperaturas de alineamiento y tamaño de productos para cada gen se detallan en la **Tabla 2**. Los valores de C_t de todos los genes analizados fueron normalizados utilizando como genes constitutivos HMBS (hydroxymethylbilane synthase) y SF3A1 (splicing factor 3a subunit 1).

Análisis estadístico

Experimento 1. Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos y determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embriones generados.

Para determinar el día (7, 8 o 9) y estadio de la bipartición (blastocisto temprano, expandido y eclosionado), se asignaron valores de acuerdo al número de demi-embriones que sobrevivieron en cada grupo de la siguiente manera: cero, ningún demi-embrión sobrevivió; uno: solo un demi-embrión sobrevivió y dos, ambos demi-embriones sobrevivieron. Los datos se analizaron usando el método de Kruskal-Wallis incluyendo ambos criterios de clasificación del embrión (día y estadio de desarrollo).

Para determinar la similitud morfológica de los demi-embriones generados inmediatamente después de la bipartición y al día 13 de desarrollo, se analizaron los diámetros y número total de células mediante una prueba t de Student para muestras dependientes. Y para determinar la similitud molecular de los demi-embriones generados después de la bipartición se analizaron los niveles de expresión génica mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa estadístico InfoStat (Buenos Aires, Argentina, 2002).

Tabla 2. Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real para la validación del microarreglo.

Gen	Secuencia de partidores	TA (°C)	Tamaño (pb)	Identificador NCBI
<i>CAMKMT</i>	F: 5' - TCATCGCAAGGAATCAGAAGG 3' R: 5' - GTCCAGAAACAGGCAGTCAG 3'	58	143	NM_001105641
<i>PLXDC1</i>	F: 5' - CTATGTGTCCCGTCTGTATGG 3' R: 5' - GTGGGTGTTGGAGAGGATTC 3'	58	135	NM_001099077
<i>SH3BGRL</i>	F: 5' - CCCTGCCACCTCAAATTTTC3' R: 5' - GCTTCTGCTTCCTTTGAACC 3'	58	133	NM_001035440
<i>HMBS</i>	F: 5' - CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG 3' R: 5' - AATGGTGAAGCCAGGAGGAA 3'	58	80	BC112573.1
<i>SF3A1</i>	F: 5' - GCGGGAGGAAGAAGTAGGAG3' R: 5' - TCAGCAAGAGGGACACAAA 3'	58	125	XM_878187.1
<i>PRSS35</i>	F: 5' - CACGGTGTTTCAGAAGGACTAC 3' R: 5' - GACAGCCTCGTTTCAGGTATC 3'	58	131	NM_001035457
<i>TFPI2</i>	F: 5' - ACGTGTATGGACTTCTGTGC 3' R: 5' - CCACACCCAGTATAGTTGAAGG 3'	58	146	NM_182788
<i>SLC18A2</i>	F: 5' - ATCCTGTTCATCGTGTTCCCTC 3' R: 5' - CTTGGCGGTCTGGATTTCTAG 3'	58	129	NM_174653
<i>NR4A1</i>	F: 5' - GGCCCAGCACTTCTAAACTG 3' R: 5' - ACTTGCGAATCACCTCCAG 3'	58	132	NM_001075911
<i>GRK5</i>	F: 5' - GAAGACCTCCGAAGAACCATAG 3' R: 5' - ACTTCATATTCTGCCACCGAG 3'	58	149	NM_174331
<i>GATSL2</i>	F: 5' - TGGAAGATGGTGCGGATTG 3' R: 5' - TCGAACTTGAAGGTGCTGATG 3'	58	125	XM_602920
<i>CDX2</i>	F: 5' - CCTGTGCGAGTGGATGCGGAAG 3' R: 5' - CCTTTGCTCTGCGGTTCT 3'	58	230	XM_871005

TA: temperatura de alineamiento. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2. Evaluación del efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* e *in vivo*

Para evaluar el efecto de la bipartición embrionaria al día 13 de desarrollo, tanto en plástico como en co-cultivo con células endometriales, se analizó el diámetro de los demi-embryones mediante una prueba *t* Student.

Para el análisis de los perfiles de expresión génica de los embriones (controles y bipartidos) se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Para comparar la tasa de recuperación y el tamaño de los embriones elongados de 17 días de desarrollo (controles y bipartidos) se utilizó la prueba *t* Student.

El análisis de los perfiles de expresión génica en embriones elongados de 17 días de desarrollo se realizó usando una prueba *t* de Student para muestras independientes.

La validación de los resultados obtenidos a partir del microarreglo se realizó a través del análisis de correlación de Pearson entre los valores de expresión génica obtenido por qPCR y los datos del microarreglo.

Para determinar los genes diferencialmente expresados se utilizó como análisis estadístico la prueba *t* de Student considerando un valor de fold change $>2,0$ y un valor de $p < 0,05$. En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa estadístico InfoStat (Buenos Aires, Argentina, 2002).

Experimento 3. Determinar el efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio

Para el análisis de correlación entre los demi-embryones congelados en estadio de blastocisto y sus contrapartes al día 13, se utilizó el análisis de correlación de Pearson.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa estadístico InfoStat (Buenos Aires, Argentina, 2002).

3. RESULTADOS

Experimento 1. Establecimiento de un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos y determinación de la similitud morfológica y molecular de los demi-embriones generados.

En este experimento, se bipartieron 247 blastocistos y la tasa de sobrevivencia de cada grupo se muestra en la **Tabla 3**. Con respecto al estadio al momento de bipartir, independiente del día de desarrollo (día 7 o día 8) en estadio de blastocisto temprano, no se obtuvieron demi-embriones viables y los blastocistos tempranos de 9 días fueron considerados como no competentes y no se incluyeron en este experimento. Además, la bipartición de blastocistos expandidos produjo demi-embriones pero con bajas tasas de desarrollo. Finalmente, al bipartir blastocistos eclosionados de día 8 o día 9 de desarrollo, se obtuvieron las tasas más altas de sobrevivencia en ambos demi-embriones. Imágenes representativas de la viabilidad de los demi-embriones producidos se muestran en la **Figura 4**. En base los resultados recién expuestos, se seleccionó el día 8 de desarrollo y el estadio de blastocisto eclosionado para continuar con los próximos experimentos. Esta decisión se basó en el hecho de que la tasa de sobrevivencia más alta de los dos demi-embriones se obtiene al bipartir los blastocistos al día 8 o 9 de desarrollo, sin embargo, al día 8 los blastocistos son más adecuados y competentes para realizar transferencia de embriones, dada la sincronía que debe existir con el útero receptor.

Tabla 3: Tasa de sobrevivencia de demi-embriones posterior a la bipartición. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

Día bipartición	Estadio embrionario	N° embriones bipartidos	Sobrevivencia demi-embriones		
			0 mitades (%)	1 mitad (%)	2 mitades (%)
7	Blastocisto temprano	20	20 (100)	0	0 ^a
	Blastocisto expandido	25	17 (68)	4 (16)	4 (16) ^a
	Blastocisto eclosionado	14	4 (28,6)	3 (21,4)	7 (50) ^{b,c}
8	Blastocisto temprano	10	10 (100)	0	0 ^a
	Blastocisto expandido	22	14 (63,6)	6 (27,3)	2 (9,1) ^a
	Blastocisto eclosionado	45	7 (15,5)	8 (17,8)	30 (66,7) ^{b,c}
9	Blastocisto temprano	-	-	-	-
	Blastocisto expandido	26	7 (26,9)	8 (30,8)	11 (42,3) ^b
	Blastocisto eclosionado	85	9 (10,6)	14 (16,5)	62 (72,9) ^c

Fuente: Elaboración propia.

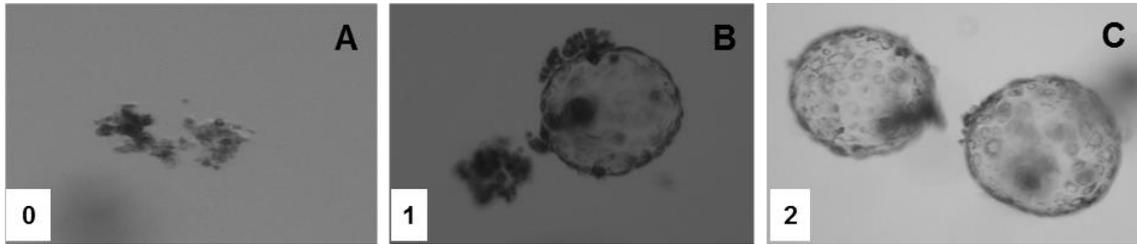


Figura 4. Imágenes representativas de la sobrevida de los demi-embryones (12 horas posteriores a la bipartición). **A:** ninguna mitad sobrevivió; **B:** una de las dos mitades sobrevivió; **C:** ambas mitades sobrevivieron. Fuente: Elaboración propia.

De todos los demi-embryones generados a partir de blastocistos eclosionados bipartidos los días 8 y 9 (grupos 6 y 9 en materiales y métodos), más del 90% conserva un MCI bien definido y casi el 70% de los pares de demi-embryones (92 pares de demi-embryones mencionados en la tabla 3) tenían un tamaño similar con una diferencia de diámetro menor al 20% (**Figura 5**). Además de la evaluación morfológica, se evaluó la homogeneidad en la expresión génica entre ambos demi-embryones. Para ello, 12 horas después de la bipartición los demi-embryones generados fueron asignados al azar en dos grupos (G1 o G2) y se analizaron 13 demi-embryones en cada grupo. Todos los demi-embryones amplificaron dentro de la región cuantificable de la curva estándar. La eficiencia de cada qPCR (incluyendo curva estándar y muestras) estaba en el intervalo de 90 a 110%, con un coeficiente de correlación de 0,9. Como resultado de este experimento, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de todos los genes analizados, *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, *TP1* y *BAX* (**Figura 6**).

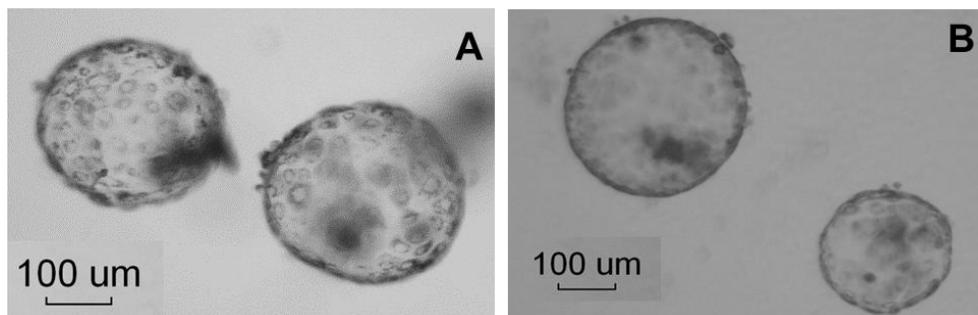


Figura 5. Imágenes representativas de la similitud de ambos demi-embryones posterior a la bipartición. **A:** ambos demi-embryones son morfológicamente similares con una diferencia de diámetro menor al 20%. **B:** ambos demi-embryones son morfológicamente diferentes, con una diferencia de diámetro superior al 20%. Fuente: Elaboración propia.

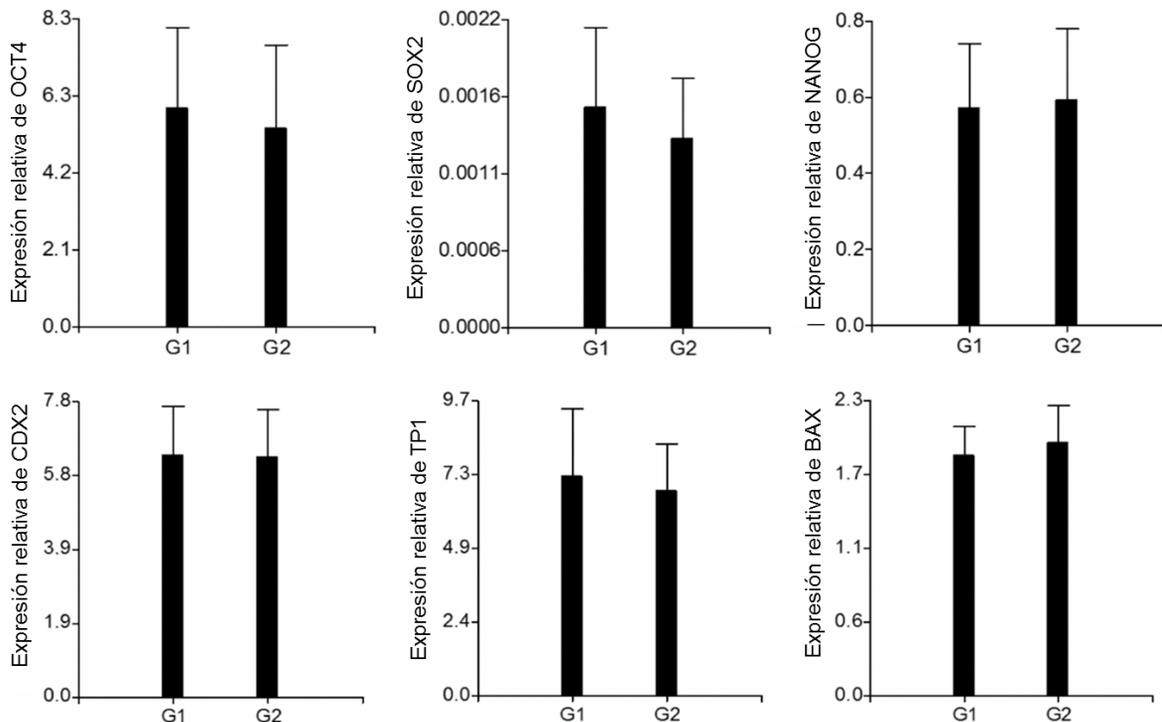


Figura 6. Análisis de la similitud de la expresión génica entre demi-embriones, 12 horas después de la bipartición. Los demi-embriones fueron asignados aleatoriamente en los grupos G1 y G2. El nivel de expresión de cada gen fue normalizado con ACTB de la misma extracción de ARN y conversión a ADNc. Fuente: Elaboración propia.

Luego de la bipartición de blastocistos en estadio eclosionado al día 8 de desarrollo, los demi-embriones con similar morfología se mantuvieron en cultivo *in vitro* hasta el día 10 del desarrollo. Todos los demi-embriones sobrevivieron a estos días de cultivo prolongado y además conservaron una similar y adecuada morfología. Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número total de células o en el diámetro entre los demi-embriones al día 10 de desarrollo *in vitro* (**Figura 7**).

Sesenta demi-embriones (30 parejas) se mantuvieron en cultivo hasta el día 13 de desarrollo (**Figura 8**), de éstos; ocho parejas fueron excluidas del análisis de homogeneidad, porque al menos una de las mitades se adhirió a la placa de cultivo, colapsó o murió (**Tabla 4**). En las 22 parejas restantes de demi-embriones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de éstos (**Figura 9A**). Catorce (63,6%) tenían un tamaño similar con una diferencia de diámetro menor al 20% (**Figuras 9B y C**), mientras que el resto tenía una diferencia de diámetro superior al 20% (**Figura 9D**).

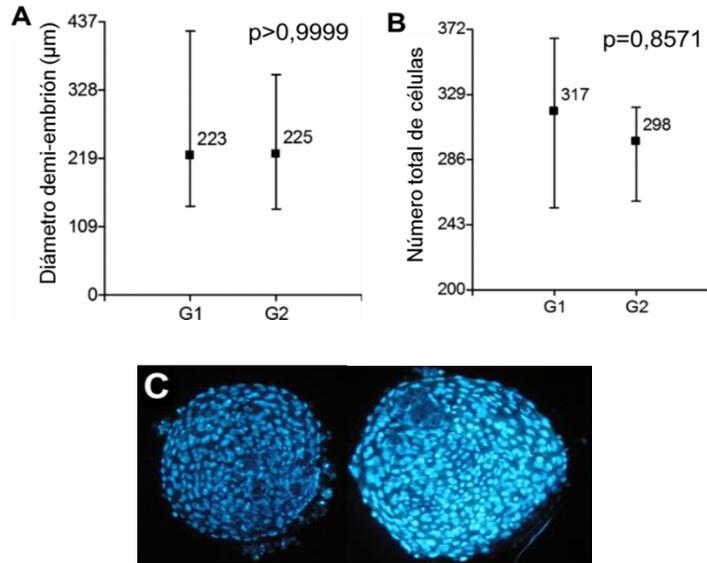


Figura 7. Determinación de la similitud morfológica de los demi-embryones generados después de la bipartición. **A:** diámetro de los demi-embryones al día 10 de desarrollo; **B:** número total de células de los demi-embryones al día 10 de desarrollo. El eje Y indica el valor mínimo y máximo de cada parámetro. Los valores dentro de cada gráfico indican los promedios por grupo. Los demi-embryones derivados de un blastocisto fueron asignados aleatoriamente a los grupos 1 o 2 (G1 y G2). **C:** imágenes representativas del número total de células de los demi-embryones al día 10 de desarrollo (tinción con Hoescht 33342). Fuente: Elaboración propia.

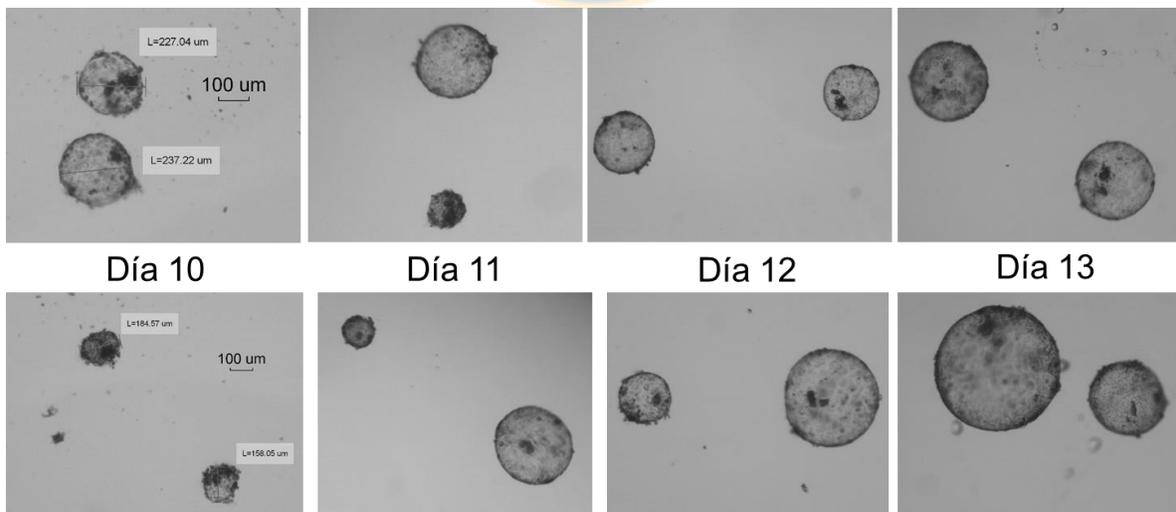


Figura 8. Imágenes representativas de la viabilidad embrionaria después de la bipartición, desde el día 10 hasta el día 13 de desarrollo. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Desarrollo *in vitro* de demi-embriones bovinos desde el día 9 al día 13.

N° parejas de demi-embriones	Sobrevida y diámetro de ambos demi-embriones (%)		Demi-embriones muertos o adheridos	
			1 o 2 demi-embriones muertos (%)	1 o 2 demi-embriones adheridos (%)
30	22 (73,3)		3 (10)	5 (16,7)
	Diámetro similar (%)	Diámetro diferente (%)		
	14 (63,6)	8 (36,4)		

Fuente: Elaboración propia.

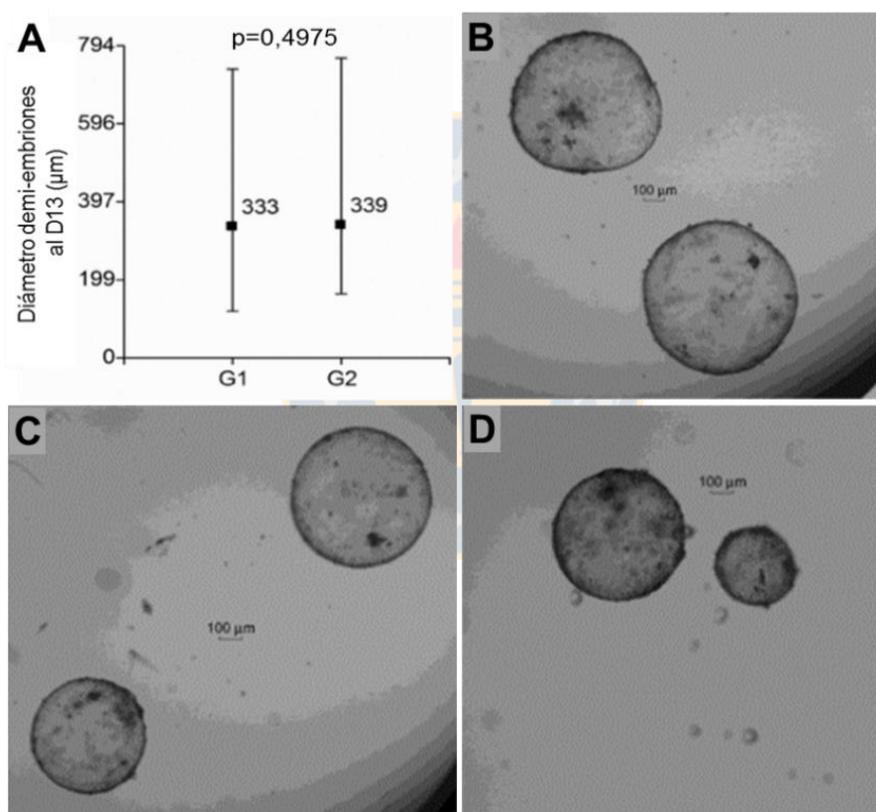


Figura 9. Evaluación de la similitud de los demi-embriones al día 13 del desarrollo. **A:** promedio del diámetro de los demi-embriones; **B-C:** imagen representativa de demi-embriones con tamaño similar (diferencia de diámetro de 4% (B) y 13% (C)); **D:** imagen representativa de demi-embriones con diferentes tamaños (39%). El eje Y indica el valor mínimo y máximo de cada variable (parámetro). Los valores dentro del gráfico indican promedios por grupo. Los demi-embriones derivados de un blastocisto fueron asignados aleatoriamente a los grupos 1 o 2 (G1 y G2). Fuente: Elaboración propia.

Al día 13, veinticuatro demi-embriones fueron congelados de forma individual para el análisis de expresión génica. Los demi-embriones generados a partir del mismo blastocisto fueron asignados aleatoriamente en dos grupos (G1 o G2). En este experimento, para el análisis de la expresión génica se seleccionaron siete genes al azar (*OCT4*, *SOX2*, *BAX*, *CDX2*, *TP1*, *TKDP1* y *EOMES*). Dos demi-embriones generados a partir de diferentes blastocistos no amplificaron dentro de la región cuantificable de la curva estándar para el gen constitutivo utilizado como normalizador; esos dos demi-embriones y sus contrapartes fueron excluidos del análisis. *EOMES* no se detectó en los demi-embriones y *SOX2* solo se expresó en dos pares de demi-embriones; los otros genes se expresaron en todas las muestras con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos G1 y G2 (**Figura 10**), excepto el gen *BAX*, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

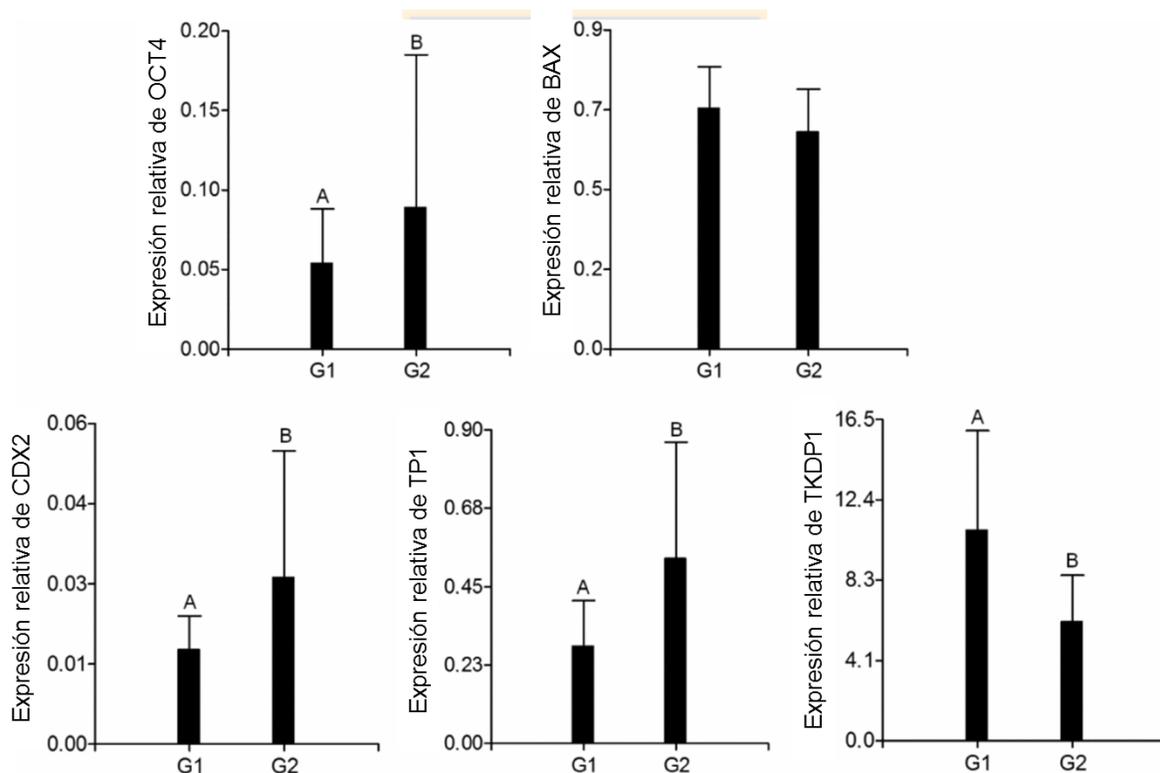


Figura 10. Análisis de la similitud en la expresión génica entre los demi-embriones al día 13 de desarrollo. Los demi-embriones derivados del mismo blastocisto fueron asignados aleatoriamente en los grupos 1 o 2 (G1 y G2). El nivel de expresión de cada gen se normalizó con la expresión de ACTB medida de la misma extracción de ARN y preparación de ADNc. Letras diferentes dentro de un gráfico indican diferencias significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2. Evaluación del efecto de la bipartición embrionaria en el estadio de blastocisto sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* e *in vivo*

Experimento 2.1: Evaluación del efecto de la bipartición sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* hasta el día 13 de desarrollo.

En este experimento se consideraron dos condiciones para el cultivo extendido de los embriones desde la bipartición hasta el día 13 de desarrollo embrionario.

Cultivo de embriones en plástico

Para este experimento se utilizó un total de 26 demi-embryones y 23 embriones control. Para los embriones control se seleccionaron blastocistos eclosionados de edad similar a los demi-embryones (al momento de la bipartición). Al día 9 (momento de inicio del cultivo extendido) los embriones bipartidos tuvieron un diámetro superior a los controles (**Tabla 5; Figura 11**). Esta diferencia se mantuvo hasta el día 10 de desarrollo (**Figura 11**), sin embargo a partir del día 11 y hasta el día 13 de cultivo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro embrionario o en la tasa de sobrevida (**Tabla 5**). En cuanto a la expresión de los marcadores trofoblásticos estudiados, se observó una tendencia a una mayor expresión en los embriones controles siendo esto significativo solo para los genes *CDX2* y *TP1* (**Figura 12**).

Cultivo en monocapa de células endometriales

Los datos del número de embriones cultivados en cada grupo (bipartido y control) así como la sobrevida y diámetro de los embriones durante todo el cultivo se presentan en la **Figura 13 y Tabla 6**. No se observaron diferencias significativas en la sobrevida entre embriones bipartidos y controles hasta el día 13 de desarrollo. De forma general los embriones del grupo control tuvieron un mayor diámetro desde el día 9 hasta el día 11 de desarrollo embrionario ($p < 0,05$), sin embargo al día 12 y día 13 de desarrollo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de los embriones de ambos grupos (**Figura 13**). Tanto los embriones bipartidos como los controles tuvieron una curva de crecimiento similar donde se observó un crecimiento lineal desde el día 9 hasta el día 12, sin embargo a partir de este día se observó una disminución en el diámetro embrionario, similar en ambos grupos (**Figura 13**).

En cuanto a la expresión génica, no se observa un patrón definido entre embriones bipartidos y controles, sin embargo similar a lo que ocurre en el sistema de cultivo convencional, la expresión de *TP1* es significativamente menor en los embriones bipartidos (Figura 14).

Tabla 5. Desarrollo embrionario desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo *in vitro* en sistema convencional (plástico).

Tipo de embrión	Total cultivado (D9)	Diámetro D9 ($\mu\text{m} \pm \text{DS}$)	Desarrollo D13		Diámetro D13 ($\mu\text{m} \pm \text{DS}$)
			Muertos* (%)	Vivos** (%)	
Bipartido	26	323,2 \pm 50,8 ^a	15 (57,7)	11 (42,3)	368 \pm 119,1
Control	23	277,3 \pm 47 ^b	10 (37)	13 (56,5)	532,2 \pm 214,8

* Se consideran muertos todos aquellos embriones que tengan signos visibles de degeneración y los que se adhirieron al plástico en algún momento durante el cultivo. a,b: letras diferentes dentro de una misma columna indica diferencias significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

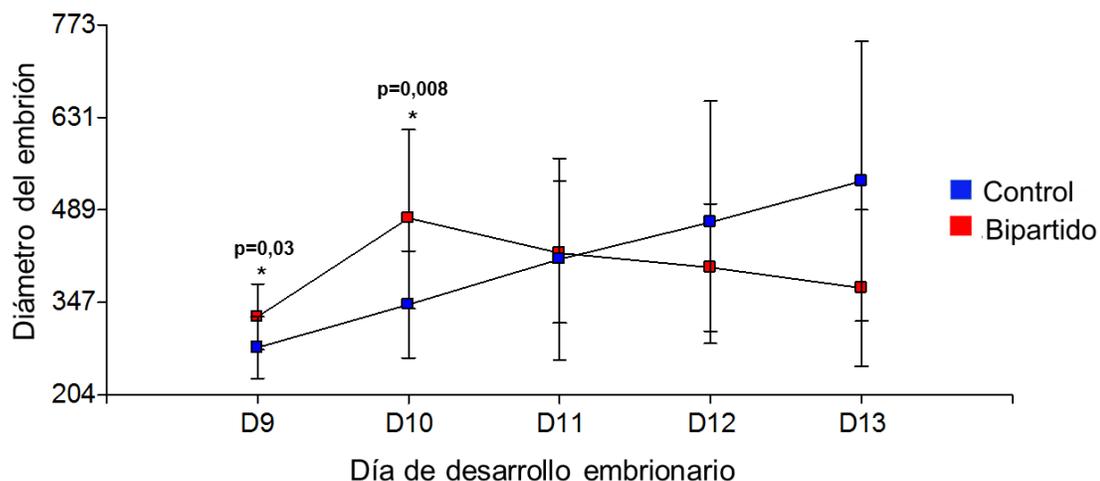


Figura 11. Diámetro de embriones bovinos cultivados en sistema convencional (plástico) desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo. Todos los embriones provienen de blastocistos eclosionados calidad I. La comparación de diámetro de demi-embryones y controles se realizó por día de desarrollo. * significa diferencias estadísticas entre el diámetro de demi-embryones y controles al mismo día de desarrollo con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

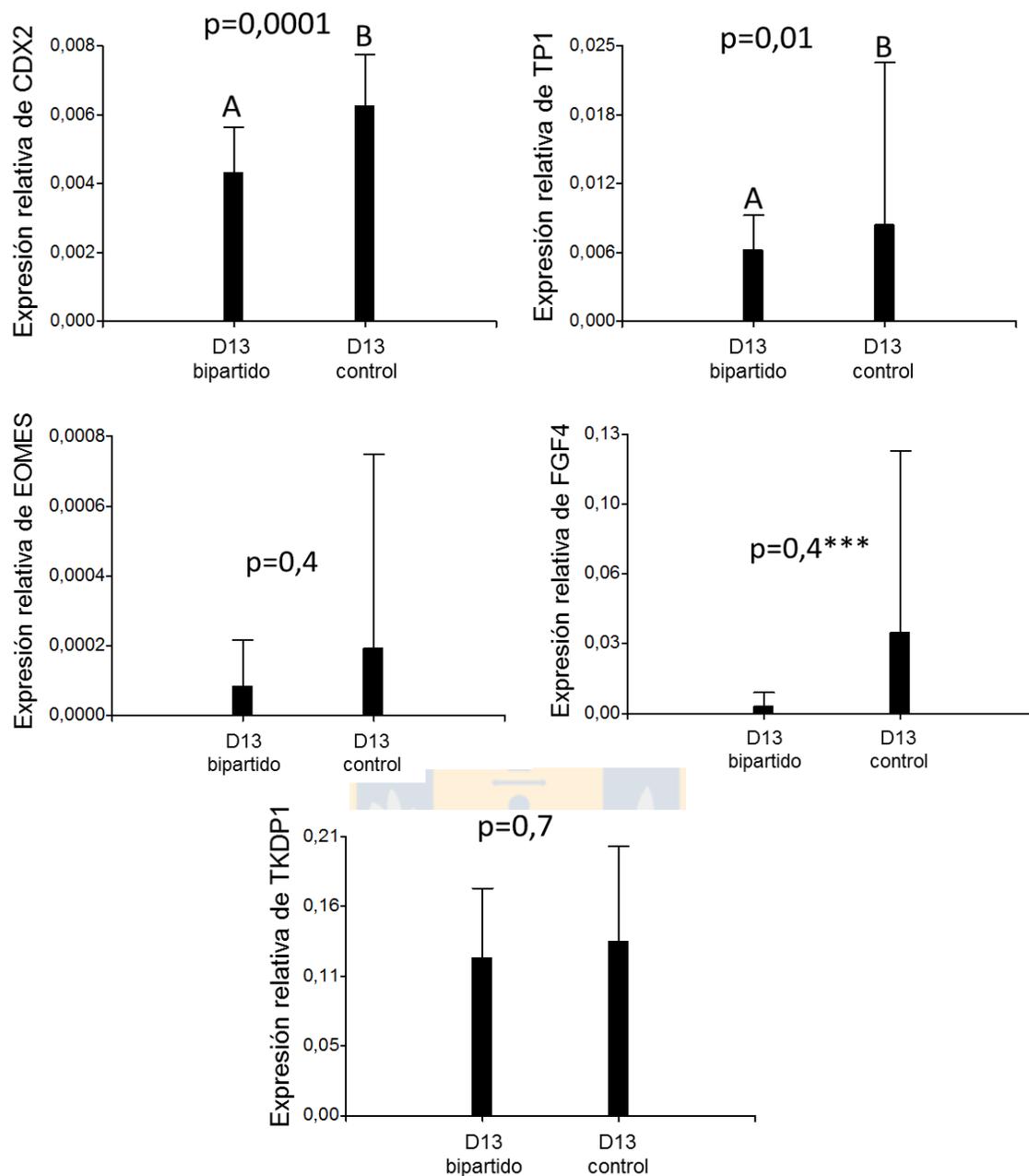


Figura 12. Expresión génica en embriones bovinos al día 13 de desarrollo *in vitro* en sistema convencional (plástico). D13 bipartido: embriones derivados de blastocistos bipartidos; D13 control: embriones derivados de blastocistos no bipartidos (controles). Letras diferentes dentro de un mismo gráfico indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Desarrollo embrionario desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo *in vitro* en sistema de co-cultivo.

Tipo de embrión	Total cultivado (D9)	Diámetro D9 ($\mu\text{m} \pm \text{DS}$)	Desarrollo D13		Diámetro D13 ($\mu\text{m} \pm \text{DS}$)
			Muertos* (%)	Vivos** (%)	
Bipartido	24	245,7 \pm 63,4 ^a	12 (50)	12 (50)	402,4 \pm 130,9
Control	26	401,5 \pm 114,3 ^b	17 (65,4)	9 (34,6)	516,4 \pm 199,5

* Se consideran muertos todos aquellos embriones que tengan signos visibles de degeneración y los que se adherieron al plástico en algún momento durante el cultivo. a,b: letras diferentes dentro de una misma columna indica diferencias significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

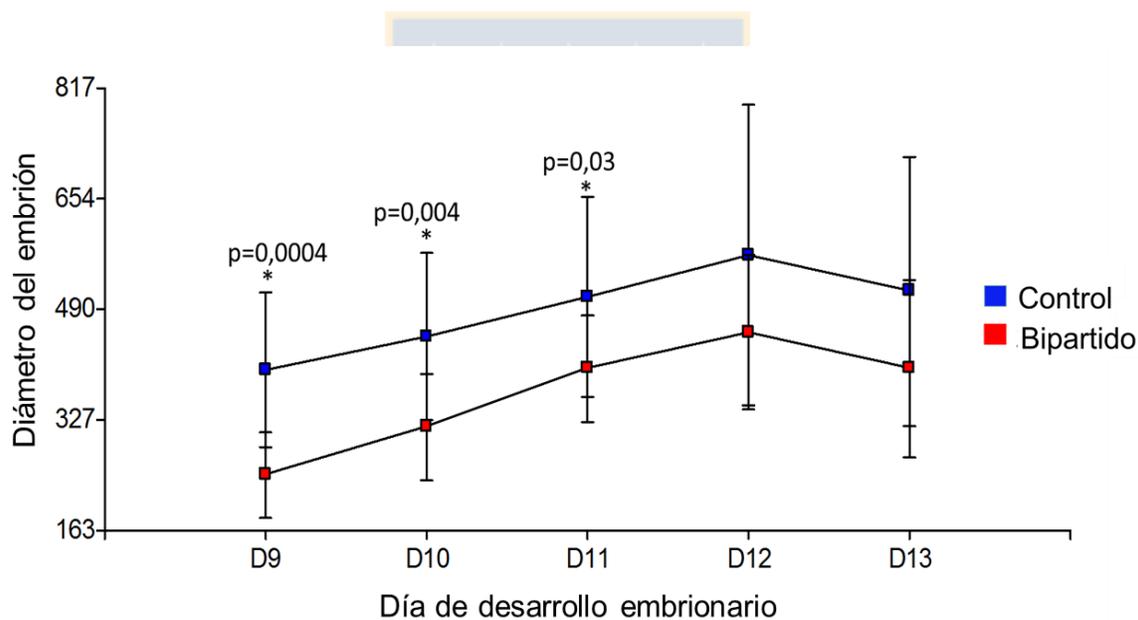


Figura 13. Diámetro de embriones bovinos cultivados en sistema de co-cultivo desde el día 9 hasta el día 13 de desarrollo. Todos los embriones provienen de blastocistos eclosionados calidad I. La comparación de diámetro de demi-embryones y controles se realizó por día de desarrollo.*: significa diferencias estadísticas entre el diámetro de demi-embryones y controles al mismo día de desarrollo con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

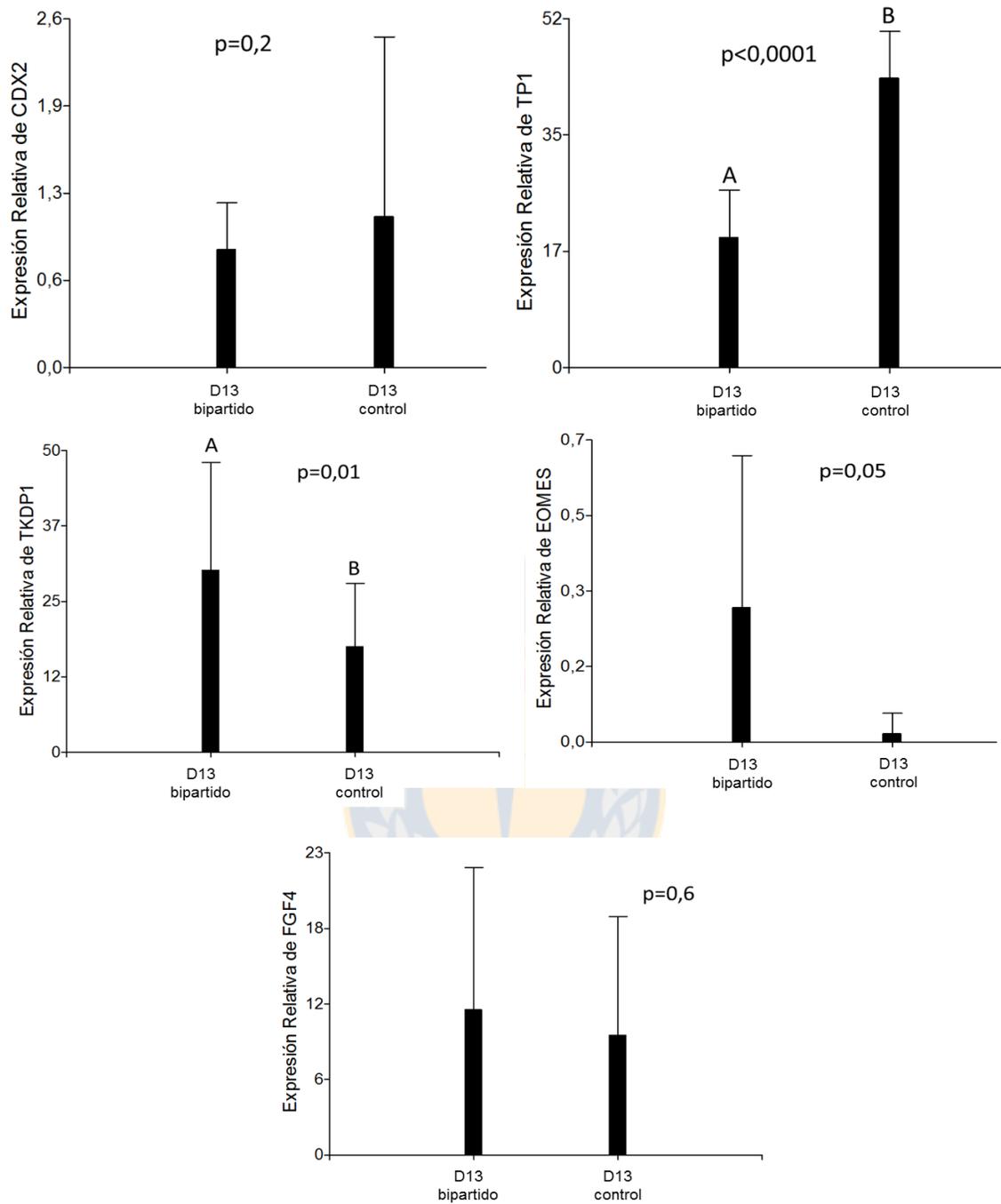


Figura 14. Expresión génica en embriones bovinos al día 13 de desarrollo *in vitro* en sistema de co-cultivo. D13 bipartido: embriones derivados de blastocistos bipartidos; D13 control: embriones derivados de blastocistos no bipartidos. Letras diferentes dentro de un mismo gráfico indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2.1: Evaluación del efecto de la bipartición sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vivo* hasta el día 17 de desarrollo.

En este experimento, se analizó el efecto de la bipartición embrionaria en el desarrollo *in vivo* hasta el día 17 de desarrollo embrionario. Para ello, se realizó la colecta de los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos los cuales fueron comparados con embriones controles (**Figuras 15 y 16**). La eficiencia de recuperación de embriones y el tamaño de éstos se resumen en la **Tabla 7**. Se recuperaron seis embriones elongados del grupo bipartido y nueve embriones elongados del grupo control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de recuperación y la longitud media de los embriones elongados entre los dos grupos. Sin embargo, cuando los embriones se clasificaron según su tamaño, más de 50% de los embriones del grupo de control tenían una longitud superior a los 100 mm, mientras que sólo el 33% de los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos alcanzaron ese tamaño (**Tabla 7**).

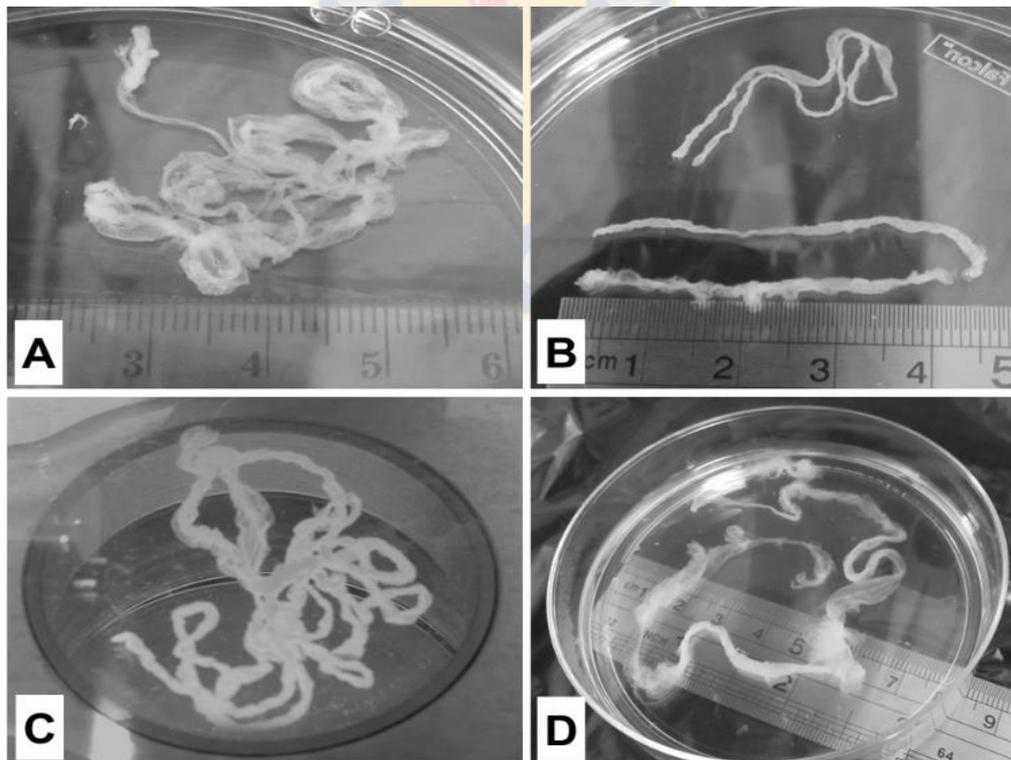


Figura 15. Embriones elongados colectados al día 17 de desarrollo. **A-B:** embriones elongados derivados de blastocistos controles (sin bipartir). **C-D:** embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos. Fuente: Elaboración propia.

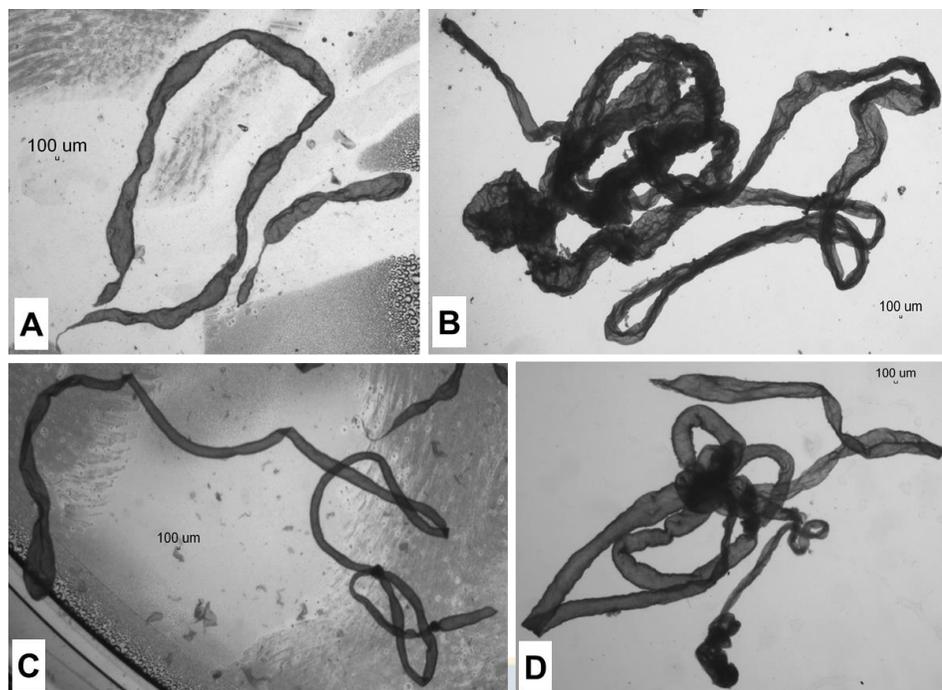


Figura 16. Microfotografías de embriones elongados colectados al día 17 de desarrollo. **A-B:** embriones elongados derivados de blastocistos controles (sin bipartir). **C-D:** embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Desarrollo *in vivo* de embriones bipartidos y controles hasta el día 17.

Tipo de embrión	Número de embriones		Tamaño (mm ± SD)	N° de embriones por rango de tamaño		
	Transferidos	Recuperados (%)		< 10mm (%)	≥ 10 y < 100 mm (%)	≥ 100 mm (%)
Bipartido	16	6 (37,5)	84,5 ± 69,3	1 (16,6)	3 (50)	2 (33,3)
Control	17	9 (52,9)	94 ± 77,6	2 (22,2)	2 (22,2)	5 (55,6)

Fuente: Elaboración propia.

Además, en este experimento se comparó el nivel de expresión de seis genes, dos marcadores de pluripotencia (*OCT4* y *SOX2*) y cuatro marcadores trofoblásticos (*CDX2*, *EOMES*, *TP1* y *TKDP1*), entre ambos grupos (embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos y controles). Para este análisis, se utilizaron sólo los embriones elongados con una longitud mayor a 10 mm. Como resultado de este análisis se obtuvo expresión en todos los genes analizados encontrándose dentro del intervalo de cuantificación de la curva estándar y con una eficiencia entre 90 a 110% y un coeficiente de correlación de 0,9. Los marcadores de pluripotencia (*OCT4* y *SOX2*) y los marcadores de la función trofoblástica *TP1* y *EOMES* se encontraban sub-expresados en los embriones

derivados de blastocistos bipartidos con respecto a los controles ($p < 0,05$; **Figura 17**), sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de *CDX2* y *TKDP1*.

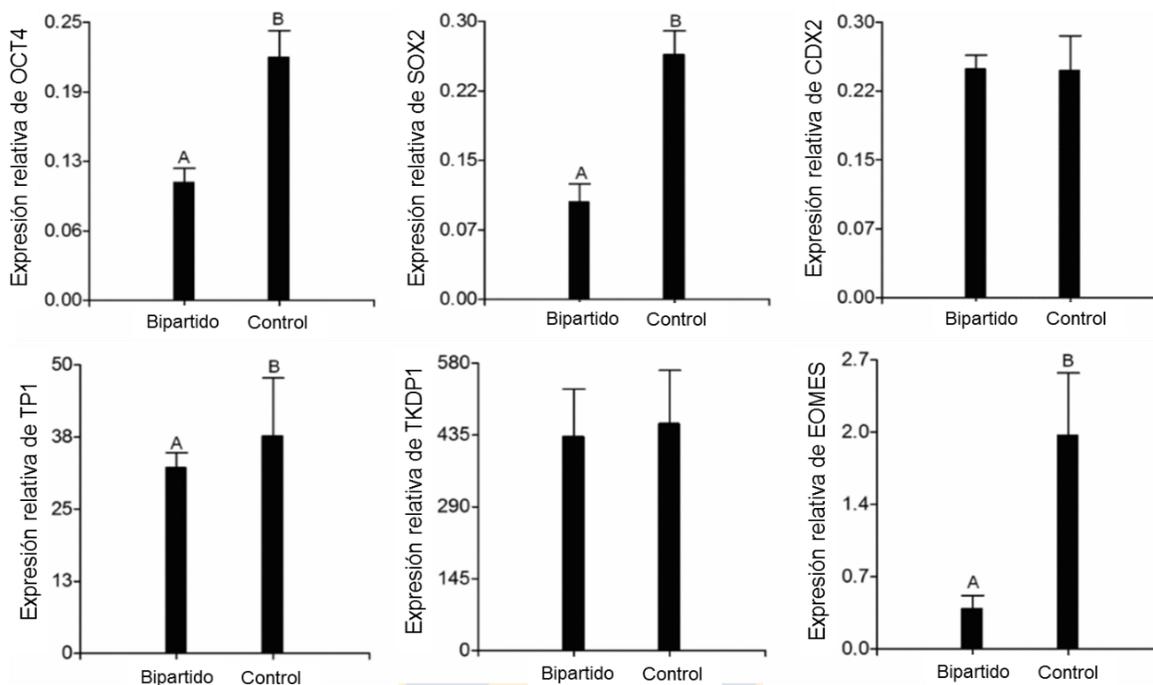


Figura 17. Análisis de expresión génica de embriones elongados de 17 días de desarrollo derivados de la transferencia de blastocistos bipartidos y controles (sin bipartir). Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron con la expresión de ACTB medida de la misma extracción de ARN y preparación de ADNc. Letras diferentes dentro de un gráfico indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Análisis de expresión génica global mediante microarreglo

Para el análisis de la expresión génica global se seleccionaron en total 10 embriones elongados de cada grupo, 5 embriones derivados de blastocistos bipartidos y 5 derivados de blastocistos controles. Los valores de RIN (RNA Integrity Number) permiten determinar la calidad de las muestras en base a un rango numérico de 1 a 10. Un valor de 10 corresponde a una muestra intacta y de buena calidad y un valor de 1 corresponde a una muestra de ARN totalmente degradada. Para los análisis de microarreglo los valores de RIN deben ser > 8.0 . Este análisis de integridad de los ARNs arrojó valores entre 8.3 y 9.2 (**Figura 18**), lo cual quiere decir que todas las muestras tenían ARNs de buena calidad e íntegros para ser analizados mediante microarreglo.

Como resultado del análisis del microarreglo se consideraron los genes diferencialmente expresados aquellos que presentaron un valor de fold change <math>< 2.0</math> (sobre o sub expresados). Se detectó un total de 29.175 transcritos expresados en todos los embriones, de los cuales 383 fueron expresados diferencialmente entre ambos grupos; 198 genes se encontraban sobre-expresados y 185 genes fueron sub-expresados en los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos (**Figuras 19 y 20**). Los 40 genes más desregulados expresados diferencialmente se presentan en la **Tabla 8**.

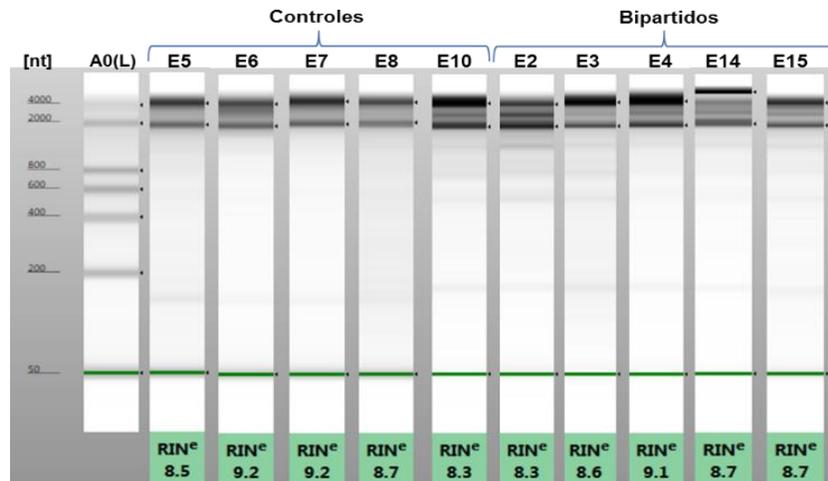


Figura 18. Análisis de la integridad de ARN por Agilent 2200 TapeStation System. Fuente: Elaboración propia.

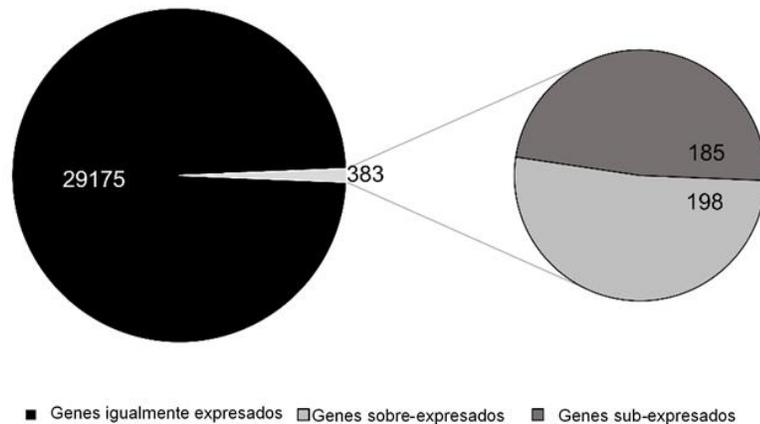


Figura 19. Descripción general de los genes diferencialmente expresados en los embriones elongados de 17 derivados de blastocistos bipartidos y controles. Los genes sobre y sub-expresados se refieren a los genes desregulados en los embriones bipartidos comparados con los controles. Fuente: Elaboración propia.

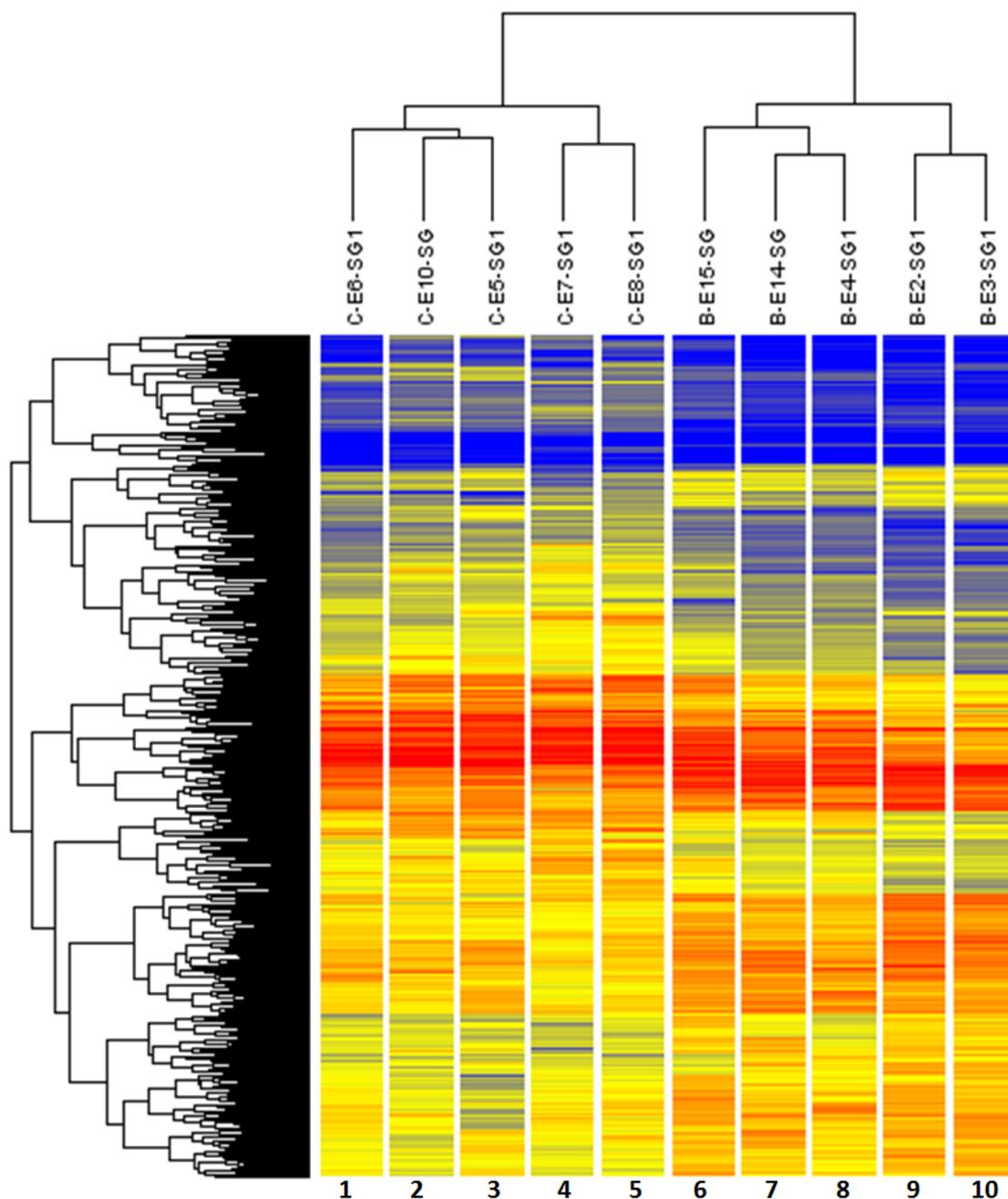


Figura 20. Agrupamiento jerárquico de todos los genes diferencialmente expresados (383 genes en total). Las columnas 1-5 representan los embriones elongados derivados de blastocistos sin bipartir (controles) y las columnas 6-10 representan a los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos. El código en la parte superior de cada columna representa el nombre de cada embrión (muestra). Las bandas de color rojo representan sobre-expresión en las muestras en comparación con la referencia, las de color amarillo representan la igualdad de expresión, y las de color azul representan la sub-expresión. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Top 40 de genes diferencialmente expresados (DEGs) entre embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos y controles.

Símbolo del gen	N° de acceso	Nombre del gen	Log FC	Expresión *
PRSS35	NM_001035457	Protease, serine, 35	-2.941	Down
SLC38A5	NM_001015580	Solute carrier family 38, member 5	-2.766	Down
TFPI2	NM_182788	Tissue factor pathway inhibitor 2	-2.708	Down
BEX2	NM_001077087	Brain expressed X-linked 2	-2.607	Down
SLC18A2	NM_174653	Solute carrier family 18, member 2	-2.581	Down
NR4A1	NM_001075911	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	-2.466	Down
SH3BGRL	NM_001035440	SH3 domain binding glutamate-rich protein like	-2.213	Down
SLC1A3	NM_174600	Solute carrier family 1, member 3	-2.152	Down
MEG3	NR_037684	Maternally expressed 3 (non-protein coding)	-2.119	Down
GSTM3	NM_001046560	Glutathione S-transferase mu 3	-2.107	Down
DSE	NM_001113232	Dermatan sulfate epimerase	-2.102	Down
MSX1	NM_174798	MSH homeobox 1	-2.07	Down
CXCL2	NM_174299	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-2.064	Down
TSPAN5	NM_001076119	Tetraspanin 5	-2.026	Down
ADAMTS9	NM_001206573	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9	-1.919	Down
ELOVL7	NM_001078042	ELOVL fatty acid elongase 7	-1.887	Down
SPON1	NM_174743	Spondin 1, extracellular matrix protein	-1.867	Down
NGFRAP1	NM_001163777	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	-1.792	Down
JAM3	NM_001105364	Junctional adhesion molecule 3	-1.735	Down
FN1	NM_001163778	Fibronectin 1	-1.541	Down
SPESP1	NM_001079773	Sperm equatorial segment protein 1	2.026	Up
UCN	NM_001032301	Urocortin	1.804	Up
PLXDC1	NM_001099077	Plexin domain containing 1	1.722	Up
HK3	NM_001101929	Hexokinase 3	1.694	Up
GRK5	NM_174331	G protein-coupled receptor kinase 5	1.687	Up
FMNL2	NM_001206821	Formin-like 2	1.683	Up
GATSL2	XM_602920	GATS protein-like 2	1.56	Up

CAMKMT	NM_001105641	Calmodulin-lysine N-methyltransferase	1.557	Up
N4BP3	NM_001205742	NEDD4 binding protein 3	1.536	Up
IRF9	NM_001024506	Interferon regulatory factor 9	1.516	Up
GPAM	NM_001012282	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	1.515	Up
SEC11C	DV780073	SEC11 homolog C (S. Cerevisiae)	1.493	Up
SFT2D2	NM_001192122	SFT2 domain containing 2	1.475	Up
GRIA2	BC122625	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2	1.459	Up
MYL1	NM_001079578	Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	1.445	Up
FAIM3	XM_588921	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	1.438	Up
PRPF8	NM_001105638	Pre-mRNA processing factor 8	1.425	Up
ZSCAN20	XM_002686492	Zinc finger and SCAN domain containing 20	1.419	Up
PHF19	NM_001192715	PHD finger protein 19	1.403	Up
STARD3	NM_001193143	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3	1.401	Up

Up o Down, se refiere a la expresión en los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos comparados con los controles. Los genes marcados con * son los que tienen mayores interacciones determinados por el software GeneMania Prediction Server. Fuente: Elaboración propia.

Ontología de genes y vías de interacción

Los términos de ontología de genes en la lista de genes diferencialmente expresados revelaron significativas ontologías asociadas con los siguientes términos GO en los procesos biológicos: homeostasis de aniones (GO: 0055081), regulación de la actividad hidrolasa (GO: 0051336), transporte de nucleótidos de purina (GO: 0015865), metabolismo de ácidos grasos acil-CoA de cadena larga (GO: 0035336), transporte de ribonucleótidos de purina (GO: 0015868) y localización de lípidos (GO: 0010876); términos GO en función molecular incluye: transporte de lípidos (GO: 0005319) y, finalmente, términos GO en los componentes celulares se incluyen: matriz extracelular proteica (GO: 0005578) y componentes intrínsecos de membrana (GO: 0031224). La lista de ontología de genes, conteo y valores de p se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Análisis de ontología de genes a partir de genes desregulados en embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos.

Acceso GO	Termino GO	p	p corregido	Conteo en la selección *
PROCESOS BIOLÓGICOS				
GO:0055081	Homeostasis de aniones	0.0001	0.576	3
GO:0051336	Regulación de la actividad hidrolasa	0.0001	0.576	14
GO:0015865	Transporte de nucleótidos de purinas	0.0003	0.576	2
GO:0035336	Metabolismo de ácidos grasos acyl-coA de cadena larga	0.0003	0.576	2
GO:0015868	Transporte de ribonucleótidos de purinas	0.0003	0.576	2
GO:0010876	Localización de lípidos	0.0003	0.576	6
FUNCIÓN MOLECULAR				
GO:0005319	Actividad transportadora de lípidos	0.0001	0.576	4
COMPONENTE CELULAR				
GO:0005578	Matriz extracelular proteica	0.0002	0.576	8
GO:0031224	Componentes intrínsecos de membrana	0.0002	0.576	40

*El conteo en la selección se refiere al número de genes involucrados en cada termino GO.

Fuente: Elaboración propia.

Los top-40 genes diferencialmente expresados que figuran en la **Tabla 8** fueron cargados en el programa GeneMania Prediction Server para determinar las posibles interacciones entre ellos. De todos los genes analizados, sólo uno (MEG3) no fue reconocido por el programa y 38 de 39 genes analizados estaban conectados. La interacción predominante fue co-expresión (74.76%). La red de interacción se muestra en la **Figura 21**. A partir de la red de interacción, 22 genes con las mayores interacciones (situados en el interior de la imagen; encerrados en la línea roja) fueron seleccionados para un análisis más profundo de la importancia en el desarrollo, utilizando GeneAnalytics (de GeneCards Suites (<http://geneanalytics.genecards.org/>)).

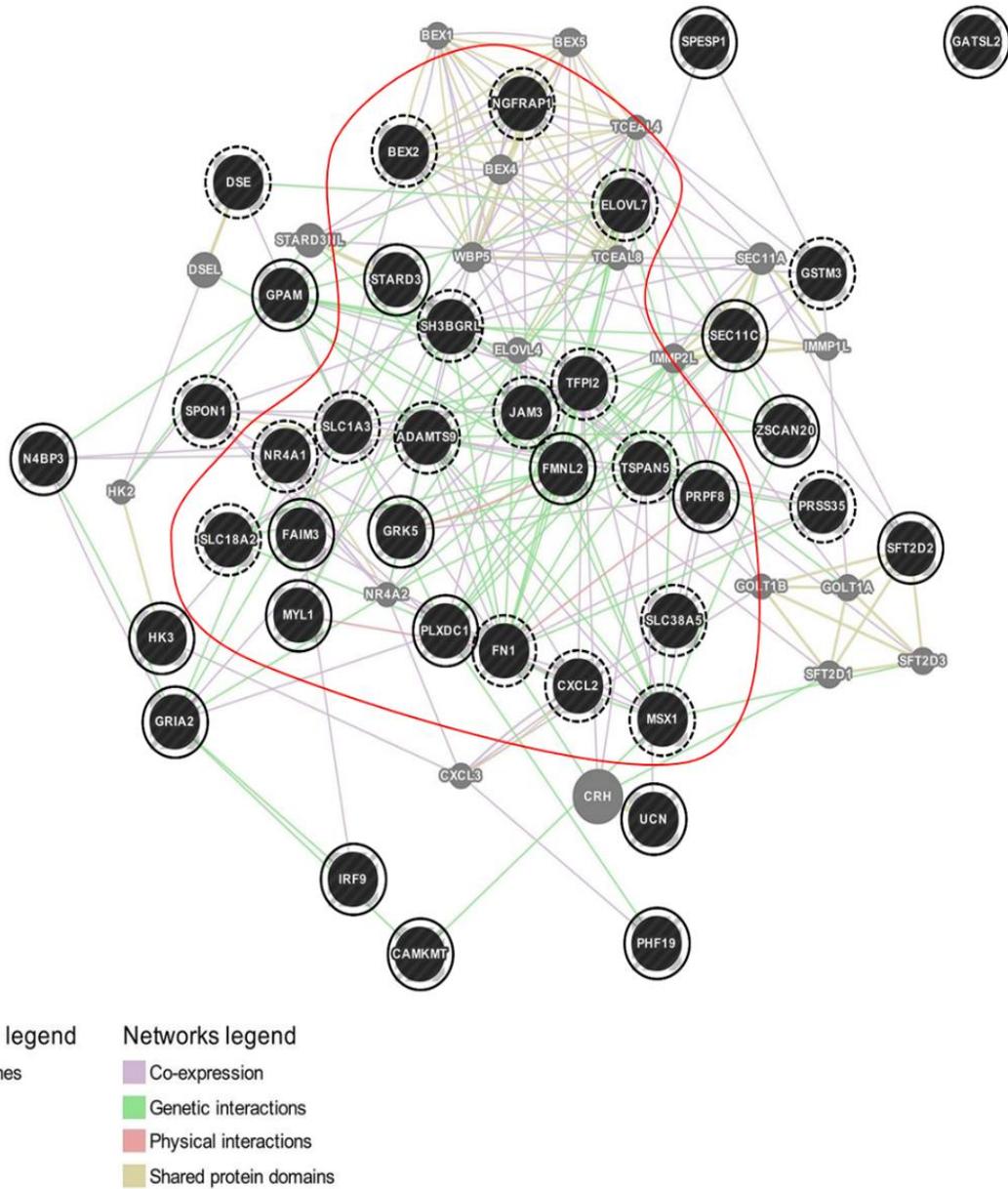


Figura 21. Redes de interacción obtenidas con el programa Gene Mania Prediction Server. En la figura se muestran las interacciones de los 38 genes con mayor diferencia de expresión en el microarreglo. De los 40 genes más diferencialmente expresados, el gen MEG3 no fue reconocido por el programa y el gen GATSL2 no tenía interacción con los otros genes. Los colores de las conexiones sugieren el tipo de interacción que se muestra en la leyenda de la figura. Los genes encerrados dentro de la línea roja ($n = 22$) son los que tienen las interacciones más altas y fueron llamados arbitrariamente como genes centrales, mientras que los que estaban por fuera de la línea roja presentando menos interacciones fueron llamados genes periféricos ($n = 16$ genes). Fuente: Elaboración propia.

Validación del microarreglo mediante qRT-PCR

Se analizaron por qRT-PCR 10 genes expresados en el microarreglo, uno de ellos igualmente expresado y 9 genes desregulados entre ambos grupos de embriones (**Figura 22**). El perfil de expresión génica de los genes seleccionados determinado por RT-qPCR coincidió exactamente con los resultados del microarreglo. La expresión de todos los genes, exceptuando *CDX2* fueron estadísticamente diferentes entre ambos grupos ($p < 0,05$). En todos los casos existe una fuerte correlación lineal entre el LogFC en el microarreglo y los valores de Log qRT-PCR ($r = 0,93$, $P < 0,05$; **Figura 23**). La lista de genes seleccionados para la validación y los datos de microarreglo y qRT-PCR se muestran en la **Tabla 10**.

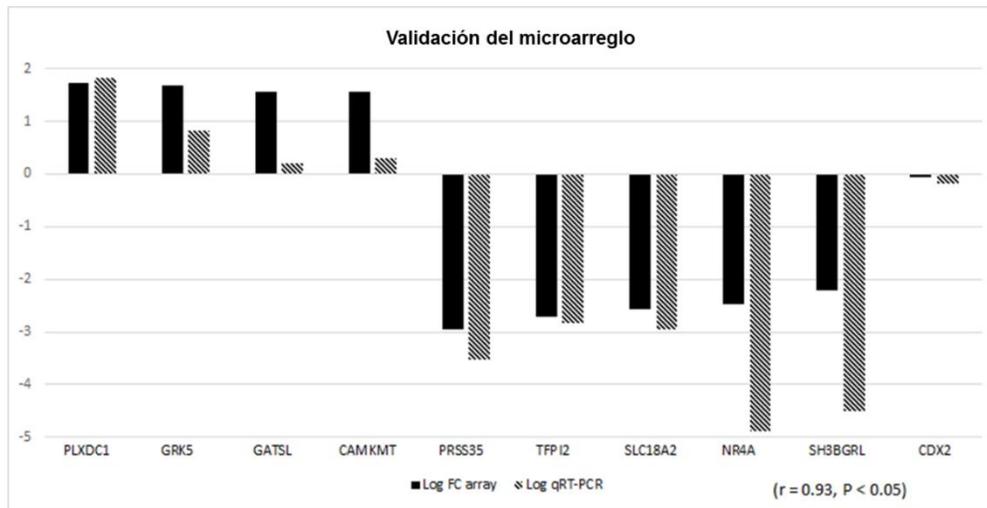


Figura 22. Validación del microarreglo mediante qRT-PCR usando la expresión relativa de genes seleccionados. La expresión de cada gen en los embriones derivados de blastocistos bipartidos fue comparado con la expresión de los embriones sin bipartir (controles: calibrador). HMBS y SF3A1 fueron utilizados como genes constitutivos en todos los análisis de qRT-PCR. Fuente: Elaboración propia.

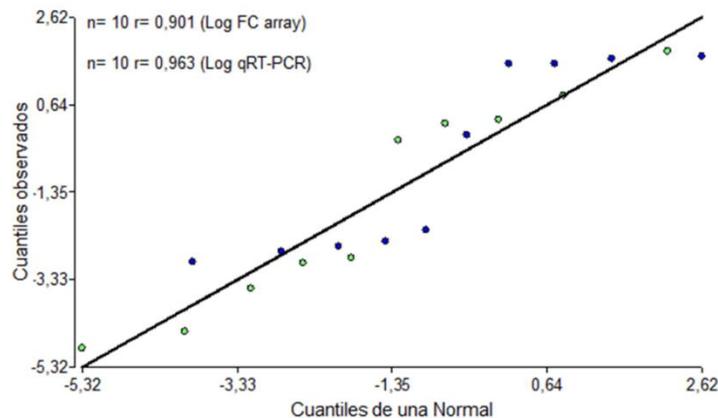


Figura 23. Análisis de correlación para la validación del microarreglo mediante qRT-PCR. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Resultados de los qRT-PCR de los genes seleccionados para la validación del microarreglo.

Nombre del gen	N° de acceso	Expresión en microarreglo (Bipartido v/s Control)	Log FC en microarreglo	Log qRT-PCR	Valor de p en qRT-PCR
PLXDC1	NM_001035024	Sobre-expresión	1,7218103	1,833983	0.0154
GRK5	NM_001075127	Sobre-expresión	1,6873214	0,831877	<0.0001
GATSL	NM_001082426	Sobre-expresión	1,5600729	0,201634	<0.0001
CAMKMT	NM_001345127	Sobre-expresión	1,5571896	0,297485	0.0001
PRSS35	NM_001031750	Sub-expresión	-2,9407911	-3,533326	0.0001
TFPI2	NM_001099043	Sub-expresión	-2,7084732	-2,831358	0.0001
SLC18A2	NM_001046082	Sub-expresión	-2,5808525	-2,949868	0.0001
NR4A	NM_174550	Sub-expresión	-2,4660408	-4,875354	0.0001
SH3BGRL	NM_003459043	Sub-expresión	-2,2134132	-4,512563	0.0001
CDX2	NM_001206299	Igual expresión	-0,056	-0,175924	0,1062

Fuente: Elaboración propia.

Experimento 3. Efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo embrionario bovino peri-implantatorio.

En este experimento se evaluó el potencial predictivo de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG sobre la capacidad de desarrollo embrionario hasta estadio peri-implantatorio. Para ello se utilizó un sistema de extensión del cultivo embrionario hasta el día 13 de desarrollo. En un experimento previo se evaluaron dos sistemas de cultivo extendido 1) Cultivo sobre plástico con medio SOFaa (placas de cultivo Nunc) y 2) Cultivo sobre monocapa de células endometriales con medio SOFaa como se describe en “Materiales y Métodos”. Sin embargo se determinó que el sistema de co-cultivo en células endometriales fue perjudicial para el desarrollo embrionario después del día 12 de desarrollo, por lo que en este experimento de evaluación de marcadores de pluripotencia solo se analizaron los datos obtenidos del sistema convencional, cultivo en plástico.

Análisis a partir de resultados de embriones cultivados sobre plástico

Se bipartieron 59 blastocitos D8 generando 26 parejas de demi-embriones con similar morfología en cuanto a diámetro total y presencia de MCI. De cada pareja de demi-

embriones, uno de ellos se utilizó para el análisis de expresión génica en estadio de blastocisto mientras que su contraparte se mantuvo de forma individual en sistema de cultivo extendido hasta el día 13 de desarrollo. Conjuntamente se cultivaron 23 embriones controles (no bipartidos) para evaluar el efecto de la bipartición sobre el desarrollo lo cual se menciona previamente en el experimento 2.1 (**Tabla 5**). De los 26 demi-embriones cultivados, once continuaron su desarrollo hasta el día 13, de forma similar a los controles. Los demi-embriones D9 utilizados para el análisis de expresión génica se dividieron en dos grupos 1) cuya contraparte no se desarrolló hasta el día 13 de cultivo *in vitro* (D9 sin desarrollo a blastocisto) y 2) cuya contraparte si se desarrolló similar a los controles (D9 con desarrollo a blastocisto).

El análisis de expresión génica de los marcadores de pluripotencia entre estos grupos de embriones mostró un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de expresión de *SOX2* y *NANOG* en los demi-embriones cuya contraparte no se desarrolló correctamente *in vitro* (**Figura 24**). Esto coincide con la correlación negativa que se observa entre la expresión de *SOX2* en los demi-embriones al D9 de desarrollo y la sobrevivencia de sus contrapartes hasta el día 13 ($r = -0,37$, $p = 0,03$). Además, se determinó una disminución significativa en los niveles de expresión de los tres marcadores de pluripotencia entre el estadio de blastocisto y el día 13 de desarrollo (**Figura 25**).

Además, se realizó un cociente entre la expresión de *SOX2* y *OCT4* entre los embriones que lograron desarrollarse hasta día 13 y los que no, como resultado se obtuvo que el cociente fue de 1,1 en los embriones que lograron desarrollarse, lo cual quiere decir que en este grupo de embriones la expresión de *SOX2* y *OCT4* fue similar. Por el contrario, el cociente en los embriones que no lograron un buen desarrollo fue de 2,3. Esto demuestra una mayor expresión de *SOX2* con respecto a *OCT4*.

Se realizó un análisis de correlación entre la expresión de los marcadores de pluripotencia en el estadio de blastocisto y el diámetro así como con la expresión de los marcadores trofoblásticos en las contrapartes al día 13 de desarrollo. Este análisis indicó una correlación positiva entre la expresión de *OCT4* y el diámetro embrionario así como entre la expresión de *SOX2* y la expresión de *TP1* al día 13 y finalmente la expresión de *NANOG* y la expresión de *EOMES* y *FGF4* al día 13 de desarrollo embrionario (**Tabla 11**).

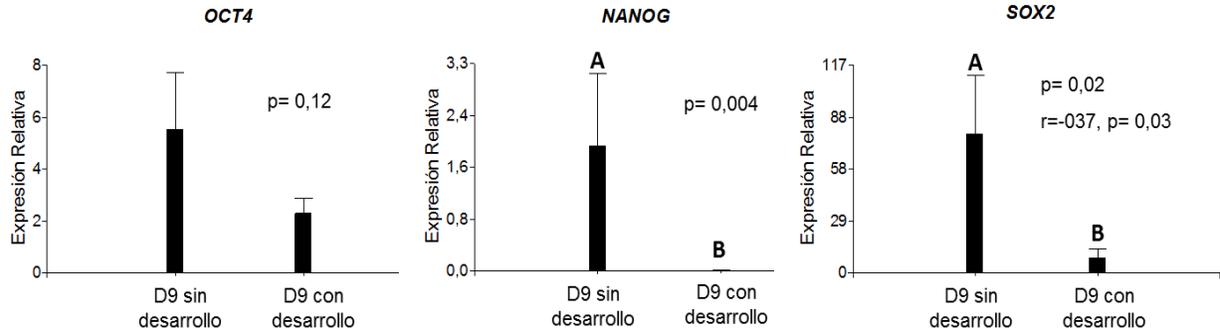


Figura 24. Expresión relativa de genes de pluripotencia en demi-embryones de día 9 de desarrollo cuya contraparte no (D9 sin desarrollo) o si se desarrolló (D9 con desarrollo) hasta el día 13 de cultivo *in vitro*. Letras diferentes dentro de un mismo gráfico significa diferencia estadísticamente significativa con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

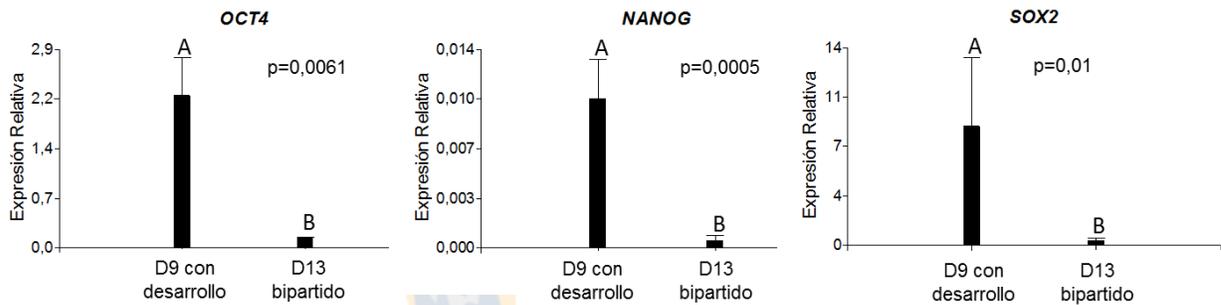


Figura 25. Expresión relativa de genes de pluripotencia en demi-embryones al D9 que lograron un buen desarrollo hasta el día 13 y sus contrapartes al día 13. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. Análisis de correlación de la expresión de los marcadores de pluripotencia al D9 de desarrollo con diámetro embrionario y expresión de genes trofoblásticos al D13 de desarrollo de las contrapartes.

Parámetro de evaluación		Día 13 de desarrollo					
		Diámetro del embrión	Expresión TP1	Expresión Eomes	Expresión FGF4	Expresión CDX2	Expresión TKDP1
Día 9 de desarrollo	Nivel de Expresión OCT4	$r=0,6; p=0,01$	SC	SC	SC	SC	SC
	Nivel de Expresión SOX2	SC	$r=0,47; p=0,04$	SC	SC	SC	SC
	Nivel de Expresión NANOG	SC	SC	$r=1; p<0,001$	$r=0,65$ y $p=0,02$	SC	SC

SC: se refiere a que no hubo correlación. Fuente: Elaboración propia.

4. DISCUSIÓN

Bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro*.

La bipartición de embriones ha sido utilizada para incrementar el número de embriones disponibles y así aumentar el número de descendencia viable en diferentes especies (Piccard *et al.*, 1985; Heyman *et al.*, 1998; Schramm y Paprocki, 2004; Illmensee *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012). Sin embargo, no todos los embriones derivados de la bipartición generan una preñez exitosa (Williams *et al.*, 1984; Seike *et al.*, 1989; Schramm y Paprocki, 2004; Tang *et al.*, 2012). La bipartición de embriones es en teoría, la manera más simple de generar gemelos idénticos y fue incorporada al conjunto de técnicas de reproducción asistida en los años ochenta (Willadsen y Polge, 1981; Ozil, 1982; 1983; Williams *et al.*, 1984). Hasta ahora, el procedimiento más aceptado es bipartir los embriones manualmente después de la compactación (mórula o blastocisto) con la ayuda de un micro bisturí y bajo un estereomicroscopio (Skrzyszowska *et al.*, 1997). A pesar de la simplicidad relativa, esta herramienta no cumplió con el esperado éxito económico que se preveía. Por otro lado, la bipartición embrionaria en diferentes etapas de desarrollo puede afectar el potencial de desarrollo de cada embrión derivado, debido a la manipulación. Factores como la propia bipartición (Mertes y Bondioli; 1985), la etapa de desarrollo del embrión al momento de la bipartición (McEvoy y Sreenan, 1990; Vajta *et al.*, 1997; Abolfazl *et al.*, 2010; Velasquez *et al.*, 2016), calidad embrionaria (Brem *et al.*, 1984; Velasquez *et al.*, 2016), método de transferencia embrionaria (Takeda *et al.*, 1986) y la sincronización de la hembra receptora (Bredbacka *et al.*, 1992), afectan el resultado y el éxito final del procedimiento.

En el experimento 1 se demostró que la bipartición de blastocistos al día 8 de desarrollo produce demi-embryones razonablemente similares en términos de capacidad de desarrollo y expresión génica. Primero se analizó la tasa de sobrevivencia de ambos demi-embryones generados después de la bipartición de blastocistos de diferentes días de desarrollo (7, 8 o 9) y diferentes estadios (temprano, expandido y eclosionado). De este experimento se concluyó que los blastocistos eclosionados, independiente del día de desarrollo, son menos susceptibles a la bipartición y fueron los que generaron la tasa más alta de sobrevivencia de ambas mitades (demi-embryones). El blastocisto eclosionado es un embrión más competente que ha sido naturalmente seleccionado ya que no todos los blastocistos tempranos o expandidos tienen la capacidad o competencia de eclosionar y continuar su desarrollo. Por otra parte, basado en nuestra experiencia, la ausencia de la zona pelúcida

simplifica la bipartición manual; el embrión eclosionado es menos “resbaladizo” y se adhiere ligeramente al fondo de la placa a diferencia de los blastocistos bipartidos en estadio temprano o expandido (aún con zona pelúcida), de esta forma se facilita el posicionamiento del microbisturí y así es posible realizar una bipartición más homogénea del embrión (se consigue una bipartición que permite tener MCI en ambas mitades). Un reporte previo demostró que la bipartición de blastocistos eclosionados reducía la muerte celular e incrementaba la sobrevida de los demi-embriones (Skrzyszowska *et al.*, 1997).

Otros estudios sugieren que los embriones son más resistentes a la manipulación como es la toma de biopsias de blastómeras a medida que tienen un mayor número de células (Vajta *et al.*, 1997; Abolfazl *et al.*, 2010). En ratones, se demostró que la bipartición de embriones en una etapa temprana de desarrollo (cuatro células), incrementaba el número de blastocistos pero no el porcentaje de embriones de buena calidad (grado I) (Tang *et al.*, 2012). En este reporte los autores confirman hipótesis previas que sugieren que las blastómeras de un embrión tienen diferentes potenciales de desarrollo. En bovinos, las biopsias de blastómeras han sido utilizadas para el sexaje de embriones y para el diagnóstico genético pre-implantatorio (El-Sayed *et al.*, 2006; Zoheir y Allam, 2010). Al igual que en humanos, en bovinos el momento de la biopsia (etapa embrionaria) se correlaciona con la sobrevida y posterior calidad embrionaria (Vajta *et al.*, 1997; Abolfazl *et al.*, 2010). En esta especie, el mejor momento para la remoción de blastómeras individuales es día 4 de desarrollo antes de la compactación. Los embriones biopsiados en este momento tienen mayores tasas de desarrollo a blastocitos y sobrevida después de la vitrificación que aquellos embriones biopsiados antes del día 4 (Vajta *et al.*, 1997; Abolfazl *et al.*, 2010). Sin embargo, estos autores sugieren que la toma de biopsia por bipartición tiene mayor éxito si los embriones son manipulados en etapas más avanzadas con un mayor número de células. Este procedimiento no solo garantizaría un mayor desarrollo embrionario, también permitiría obtener un tamaño de muestra más grande y representativa, lo cual facilita su procesamiento para el diagnóstico molecular. No obstante, es importante mencionar que el momento de la toma de biopsia va a depender de la pregunta biológica y el diagnóstico que se quiere realizar.

En algunas especies como es el caso de bovinos, la evaluación embrionaria se realiza en la etapa de blastocisto, siendo este el momento cuando los embriones se clasifican para la transferencia a una hembra receptora. Desde el punto de vista del programa de desarrollo, en este punto ocurrieron procesos biológicos cruciales (EGA, compactación y primera

diferenciación celular) que tienen un impacto significativo en la continuidad del desarrollo. La primera diferenciación celular genera la formación del MCI y el TB, lo que lleva a la secreción de las primeras señales de reconocimiento de la gestación como el interferón tau (*TP1*) (Viebahn, 1999; Degrelle *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2008). Así, la biopsia del blastocisto aparece como una posibilidad tentadora para el estudio de perfiles de expresión génica y predecir el futuro desarrollo del embrión (Hoelker *et al.*, 2006). Sin embargo, en el proceso de realización de una biopsia de blastómeras, solo se puede obtener información parcial en términos de expresión génica, ya que se obtienen células del MCI o del TB, pero no de ambas partes. En cambio esto se puede lograr fácilmente si se obtienen mitades en vez de biopsias de blastocistos individuales vía bipartición embrionaria.

En este trabajo, la mayoría de los demi-embriones re-expandieron normalmente después de la bipartición, manteniendo una morfología similar (presencia de MCI y diámetro adecuado) y mostraron un patrón de expresión génica similar. Este resultado demuestra que durante las primeras 12 horas después de la bipartición no hay cambios significativos en los demi-embriones derivados de un solo blastocisto, y en este punto, estos pueden ser considerados embriones homogéneos o morfológica y genéticamente similares, con la misma competencia de desarrollo (Albihn *et al.*, 1990). Sin embargo, 12 horas después de la bipartición, la mayoría de los demi-embriones son más pequeños en diámetro que los embriones originales (datos no mostrados). No obstante, el diámetro embrionario a la etapa de blastocisto no se correlaciona con el número de células del trofoectodermo, del MCI o el número total de células como tampoco con las características de desarrollo posteriores a la transferencia del embrión (Hoelker *et al.*, 2006).

Con el objetivo de verificar el efecto a largo plazo de la bipartición, se evaluó el potencial de desarrollo y similitud al día 13 de desarrollo de ambos demi-embriones derivados de un blastocisto eclosionado. Para esto, parejas de demi-embriones morfológicamente similares fueron mantenidos en cultivo y evaluados al día 10 y día 13 de desarrollo. La ventaja de un cultivo extendido en el tiempo (hasta día 13) de los demi-embriones radica en la posibilidad de incrementar el período de observaciones y la ventana de desarrollo para estos embriones. Anteriormente, otros grupos reportaron que el cultivo *in vitro* extendido sirve como herramienta para evaluar el potencial de desarrollo de embriones bovinos más allá del estadio de blastocisto al día 7 (Voelkel *et al.*, 1985; Machado *et al.*, 2013). En nuestra experiencia, los embriones bovinos pueden mantenerse en cultivo durante el período

correspondiente a la tapa ovoide, manteniendo una morfología concordante con este período.

Inmediatamente después de la bipartición, la mayoría de los demi-embriones presentaron células trofoblásticas visiblemente degeneradas (picnóticas y sin definición de membrana); sin observarse diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de los embriones o el número total de células al día 10. Al día 11, los demi-embriones derivados del mismo embrión comenzaron a mostrar morfología y crecimiento independientes, donde en varios casos, uno de ellos colapsó o redujo la velocidad de crecimiento y terminó como un embrión pequeño comparado con su contraparte. Este hecho es confirmado al día 13 cuando menos del 65% de los pares de demi-embriones mantuvieron un tamaño similar con una diferencia de tamaño de menos del 20%. Sin embargo, al final del período de cultivo evaluado, hubo una mejora general de la calidad embrionaria, manifestada al día 13, ya que la mayoría de los demi-embriones mostraron un trofoblasto bastante compacto con una superficie muy definida. En humanos, la remoción de una blastómera en la etapa de 6 a 8 células demostró que aunque la biopsia no afecta la tasa de primera división, sí retarda temporalmente el desarrollo del embrión; sin embargo, estos embriones se recuperan y eclosionan de la zona pelúcida al mismo tiempo que los controles no biopsiados, aunque con un tamaño significativamente menor (Kirkegaard *et al.*, 2012).

Adicionalmente, de los cinco genes que fueron estudiados, cuatro de ellos fueron diferencialmente expresados en los grupos 1 y 2, lo que sugiere que al día 13, los demi-embriones derivados del mismo blastocisto no conservan la similitud en el perfil de expresión génica. En el caso de *EOMES*, este marcador no fue detectado en ninguno de los embriones de este experimento. Esta falta de expresión podría ser una consecuencia del procedimiento de cultivo *in vitro* o bien podría tratarse de un error técnico porque en el experimento 3, si fue posible detectar *EOMES* al día 13 de desarrollo.

En un estudio anterior, se comparó la expresión de un conjunto de genes de embriones bovinos al día 14, producidos *in vivo*, *in vitro* y transferidos al día 7 a hembras receptoras o cultivados posterior a la eclosión (PHD-post hatching development). Estos autores encontraron que los embriones del sistema PHD mostraron una expresión más alta de los genes *PLAC8*, *SOD2* y *SLC2A3* en comparación con los embriones que se desarrollaron *in vivo* por al menos unos pocos días (Machado *et al.*, 2013). En nuestro estudio, los embriones bipartidos transferidos a receptoras expresaron *EOMES* al día 17 de desarrollo. De manera similar a *EOMES*, *SOX2* no fue expresado en la mayoría de las muestras

estudiadas, pero fue expresado y cuantificado en todos los embriones elongados *in vivo*. Estos resultados demuestran que el estrés de las condiciones de cultivo *in vitro* puede afectar la competencia de desarrollo de los embriones, por lo tanto es razonable esperar un efecto del cultivo prolongado *in vitro* en la capacidad de desarrollo y perfiles de expresión génica de los embriones. Sin embargo, la ausencia de modelos adecuados de elongación *in vitro* de embriones en especies de implantación tardía, nos llevó a probar un sistema intermedio en el cual los embriones puedan permanecer por períodos más extendidos y lograr sobrevivir.

Efecto de la bipartición sobre la capacidad de desarrollo peri-implantatorio

Los embriones producidos *in vitro*, por lo general se evalúan al día 7 de desarrollo y es en este período donde se concentran la mayoría de las investigaciones. Sin embargo, existen pocos estudios centrados en las etapas posteriores a la eclosión del blastocisto, que es donde se produce el mayor número de pérdidas de gestación (Bertolini *et al.*, 2002; Diskin y Morris, 2008; Alexopoulos y French 2009; Clemente *et al.*, 2011; Mamo *et al.*, 2011). Por lo tanto, el estudio de los embriones en estas etapas proporciona información importante con respecto al desarrollo embrionario.

En el experimento 2 se evaluó la capacidad de desarrollo peri-implantatorio *in vitro* de blastocistos posterior a la bipartición, cultivados en plástico y en co-cultivo con células endometriales, en términos de diámetro y expresión génica. Se ha demostrado que blastocistos con mayor diámetro tienen un mejor potencial de desarrollo que los blastocistos de menor diámetro (Racowsky *et al.* 2003). El experimento realizado en plástico mostró que al día 9 (momento de inicio del cultivo extendido) los embriones bipartidos tuvieron un diámetro superior a los embriones controles, esto debido probablemente a un efecto de la rigurosa selección de los mejores embriones para la bipartición, por lo que no es considerado como un efecto de la bipartición como tal. Posterior a la bipartición, los demi-embryones, tanto controles como bipartidos, tuvieron un crecimiento lineal similar a lo reportado por van Leeuwen y colaboradores el año 2015. Sin embargo, en los embriones bipartidos esta tendencia se modificó a partir del día 11, desde ese momento, los demi-embryones comenzaron a tener una menor tasa de crecimiento, mientras que los embriones controles continuaron su crecimiento lineal. Esta tendencia de los demi-embryones podría estar mostrando un efecto negativo tardío de la bipartición, que no se observa durante los primeros días de cultivo.

En cuanto a la expresión de los marcadores trofoblásticos estudiados, se observó una tendencia a una mayor expresión en los embriones controles siendo esto significativo solo para los genes *CDX2* y *TP1*. Sin embargo, esto podría tener trascendencia para la continuidad del desarrollo de los embriones bipartidos ya que *CDX2* es el marcador más temprano para la determinación trofoblástica y por tanto es imprescindible para mantener la función de este tejido. Además, *CDX2* es un elemento clave que determina la activación de células del trofoblasto para la expresión de *TP1* (Sakurai et al., 2009). Por otra parte, *TP1* es secretado por las células mononucleares del trofoectodermo y es la principal citoquina implicada en el proceso de reconocimiento embrio-materno en rumiantes (Imakawa et al., 2004). Una disminución en la expresión de este gen podría comprometer el éxito de la implantación y la continuidad del desarrollo.

El experimento realizado en co-cultivo con células endometriales mostró una disminución en el diámetro embrionario a partir del día 12 en ambos grupos (bipartidos y controles). Esto puede ser el resultado del sistema de co-cultivo. Coincidentemente con esa etapa del cultivo, las células comenzaron a mostrar cambios morfológicos y desprendimiento de la placa de cultivo, lo que podría indicar un agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo o un incremento en productos de desecho perjudiciales para los embriones. Estos cambios podrían contribuir negativamente al crecimiento embrionario por lo que la reducción en el diámetro en ambos grupos podría ser una consecuencia del sistema de cultivo más que de la competencia embrionaria. Estos resultados son contradictorios a lo observado en un estudio realizado en ratones, donde tras el co-cultivo de embriones con células endometriales, se observó que tanto el recuento celular como el diámetro de los blastocistos fue significativamente mayor en los grupos co-cultivados con células endometriales que en el grupo control (Azadbakht y Valojerdi, 2008). Además, recientemente se ha descrito que el co-cultivo con células epiteliales oviductales y vesículas extracelulares (EVs) provenientes de estas células, tienen un efecto positivo en la calidad de embriones producidos *in vitro*, sugiriendo una comunicación funcional entre el oviducto y el embrión en estadios tempranos de desarrollo (Lopera-Vásquez et al., 2016). Sin embargo, en un estudio realizado por Goff y Smith en 1998, se obtuvieron resultados similares a los nuestros. Estos investigadores co-cultivaron embriones utilizando células epiteliales oviductales y células endometriales y además realizaron co-cultivo con células endometriales suplementadas con progesterona y estradiol. Los resultados de este experimento mostraron que en ambos sistemas de co-cultivo se obtuvo desarrollo hasta

blastocisto, no obstante el tamaño de estos fue significativamente menor en los embriones cultivados en células endometriales.

En general y basado en los resultados obtenidos en este experimento, se podría decir que la bipartición tiene un efecto sobre el desarrollo embrionario que no es observable en el corto plazo pero sí en un período más avanzado pero que involucra una etapa transcendental que se refiere a la comunicación embrio-materna. Para comprobar esta hipótesis se realizó un experimento *in vivo*, donde se transfirieron embriones bipartidos y no-bipartidos (controles) a hembras receptoras previamente sincronizadas. Los embriones fueron posteriormente colectados al día 17 de desarrollo. Se evaluó el efecto de la bipartición sobre la competencia embrionaria comparando la longitud del embrión y la expresión génica en dichos embriones.

Con respecto a la tasa de recuperación de embriones elongados, esta fue menor en los embriones provenientes de blastocistos bipartidos, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de embriones. No obstante, otros resultados en la literatura utilizando este procedimiento son bastante inconsistentes, por lo que la tasa de recuperación podría no ser considerado como un buen parámetro para determinar la calidad embrionaria (Bertolini *et al.*, 2002; Alexopoulos y French, 2009; Rodriguez-Alvarez *et al.*, 2010a; Machado *et al.*, 2013). Por otra parte, en ambos grupos de embriones elongados (bipartido y control) se recuperaron embriones con diferentes tamaños y se observó un tamaño promedio similar al día 17 de desarrollo. Este resultado está en concordancia con estudios previos que describen una alta variabilidad en tamaño entre embriones elongados de la misma edad (Bertolini *et al.*, 2002; Maddox-Hyttel *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2009; Rodriguez-Alvarez *et al.*, 2010a; Machado *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro experimento la mayoría de los embriones elongados derivados de blastocistos bipartidos tuvieron una longitud menor a 100 mm; no está claro si esto puede afectar la implantación futura del embrión, pero podría estar reflejando un efecto negativo de la bipartición en el desarrollo embrionario. Esto concuerda con lo descrito por Betsha y colaboradores en 2013, ellos observaron que embriones elongados producidos por transferencia nuclear somática eran más pequeños que los embriones controles.

En el estudio de genes individuales se encontró que los marcadores de pluripotencia *OCT4* y *SOX2* así como dos marcadores trofoblásticos, *EOMES* y *TP1*, se encontraron sub-expresados en los embriones bipartidos. En bovinos, pareciera ser que *OCT4* no es solo responsable del mantenimiento de la pluripotencia de las células embrionarias. Este gen

también se encontraba expresado en trofoblasto de embriones bovinos en la etapa filamentosa, lo que sugiere una contribución al mantenimiento de un trofoblasto indiferenciado compatible con una proliferación celular activa durante la elongación (Degrelle *et al.*, 2005). La sub-expresión de *OCT4* en los embriones bipartidos podría apuntar a una diferenciación temprana del trofoblasto, contribuyendo a una reducción de la proliferación celular y consecuentemente, a un acortamiento de la longitud de los embriones. La sub-expresión de *EOMES* podría contribuir también a la baja proliferación de las células trofoblásticas en los embriones bipartidos.

TP1 es una proteína producida por el trofoectodermo de embriones bovinos y su rol es el establecimiento de la preñez mediante la inhibición de la luteólisis (Roberts *et al.*, 1992; Bazer *et al.*, 1997). La reducción en la secreción de *TP1* ha sido asociada con bajas tasas de preñez después de la transferencia de embriones poco competentes, como los derivados de TNS o bipartición embrionaria (Stojkovic *et al.*, 1999). Stojkovic y colaboradores ya en 1999 encontró una correlación positiva entre el área trofoblástica y la secreción de *TP1* en embriones producidos por FIV y producidos *in vivo* ($r=0,60$ y $r=0,68$ respectivamente) pero no en embriones producidos por TNS o bipartición. Similar a esto, encontramos una correlación positiva entre el nivel de expresión del ARNm de *TP1* y la longitud embrionaria en los embriones controles al día 17 ($r=0,88$; $p=0,02$), pero no en los embriones bipartidos ($r=0,2$; $p=0,7$). Este fenómeno indica una obvia sub-expresión en embriones bipartidos que causa una reducida viabilidad y competencia de estos embriones.

Además del estudio de genes individuales, en este experimento se realizó un estudio de transcriptómica global con el objetivo de determinar las vías de señalización más afectadas como consecuencia de la bipartición en el estadio de blastocisto. Encontramos 383 genes diferencialmente expresados en embriones bovinos elongados derivados de embriones bipartidos comparados con embriones controles. De estos, 198 genes fueron sobre-expresados y 185 genes fueron sub-expresados en embriones bipartidos. Mediante un análisis de q-RT-PCR se validó el procedimiento del microarreglo para los 10 genes seleccionados, demostrándose concordancia entre los resultados del microarreglo y los resultados del q-RT-PCR.

La transcriptómica global representa una ventaja cuando se estudia la expresión génica en embriones tempranos debido a que permite un rápido estudio de una gran cantidad de genes, incluso si la muestra de interés contiene pequeñas cantidades de material genético. Sin embargo, el análisis de los resultados de microarreglo requieren un enfoque complejo

y este debe centrarse en los genes que están ampliamente desregulados (top 40 del estudio) y su significado biológico, ontología de genes (GO) y red de interacciones entre ellos. Por lo tanto, se encuentra fuera de los objetivos de este trabajo discutir la función biológica de todos los genes diferencialmente expresados individualmente, en su lugar se realizó un análisis general de las vías y mecanismos desregulados.

En el análisis de GO, varios procesos biológicos se vieron afectados por el proceso de bipartición, los que incluyen la homeostasis aniónica, actividad hidrolasa, transporte de purinas y localización y metabolismo de lípidos. La actividad transportadora de lípidos y componentes intrínsecos de membrana fueron las funciones moleculares y componentes celulares mayormente afectados. Nuestros resultados, están en concordancia con otros análisis transcriptómicos de embriones elongados que muestran en general que similares desregulaciones de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, aunque utilizando otros diseños experimentales (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010a; 2010b; Gad *et al.*, 2012; Betscha *et al.*, 2013).

Utilizando el servidor de predicciones “Gene Mania” se mapeó la red de interacciones de los genes diferencialmente expresados. Para un análisis más detallado, la red global de interacciones fue dividida en dos fracciones; 1) genes ubicados centralmente y 2) genes ubicados periféricamente. El objetivo de esto fue enfocarse en aquellos genes que mostraron mayores interacciones (ubicados centralmente en la figura 3). En general, la mayoría de los genes ubicados en esta área se encontraban sub-expresados en los embriones bipartidos (15 de 22 genes). Además, se identificaron 3 vías que resultaron estar mayormente afectadas en los embriones bipartidos: la vía de las integrinas (*JAM3*, *FN1*, *CXCL2*), degradación de la matriz extracelular (*ADAMTS9*, *JAM3*, *FN1*) y la vía de transporte de glucosa y otros azúcares (Familia SCL).

La vía de las integrinas es crucial durante el proceso de reconocimiento embrio-materno e implantación (Blomberg *et al.*, 2008). Las integrinas permiten la interacción célula a célula y juegan un rol importante en la transducción de señales, lo que puede gatillar la diferenciación trofoblástica y migración celular (Das *et al.*, 2002; Jaeger *et al.*, 2005). En algunos casos, *JAM3* (junctional adhesion molecule 3; -1,735) se ha visto involucrada en la formación de uniones estrechas y el control del traspaso de agua. Las uniones estrechas juegan un rol crucial durante la elongación de los embriones y la adhesión al endometrio durante la implantación en ovinos (Satterfield *et al.*, 2007). En ratones, *JAM2* es un importante parálogo de *JAM3*, y media la interacción entre los blastocistos eclosionados y

el endometrio (Su *et al.*, 2012). *JAM2* ha sido encontrado altamente desregulado en embriones bovinos elongados de menor calidad, como embriones clonados o producidos *in vitro* en comparación con sus contrapartes producidos *in vivo*, demostrando un gran efecto de la manipulación embrionaria temprana en la interacción célula a célula durante el período de elongación (Tesfaye *et al.*, 2007; Betscha *et al.*, 2013).

Igualmente, *FN1* (fibronectin; -1541), está involucrado en las vías de integración y degradación de la matriz extracelular, es expresada en el endometrio bajo el efecto de la progesterona y media la migración y adhesión de las células de la decidua y además inhibe la invasión del trofoblasto en humanos (Dominguez *et al.*, 2015). *CXCL2* (chemokine (C-X-C motif) ligand 2; -2,064) está relacionado con respuestas inflamatorias e inmunomodulación durante la preñez en humanos (Huang *et al.*, 2013). En cerdos, *CXCL2* es expresado en la placenta y podría jugar un rol durante la preñez temprana regulando el desarrollo fetal (Kim *et al.*, 2010). También *CXCL2* es expresado en células del cúmulo de ovocitos humanos y su expresión se relaciona negativamente con la maduración del ovocito (Huang *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen evidencias de la expresión de este gen en ningún estado, por lo que permanece poco claro si la regulación de *CXCL2* en embriones bipartidos en este trabajo podría ser perjudicial para el futuro desarrollo o implantación.

ADAMTS9 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 9; -1.919) codifica una proteína miembro de la familia de desintegrinas y metaloproteinasas con motivo trombospondina. Los miembros de esta familia comparten distintos módulos de proteínas, incluyendo una región pro-péptido, un dominio metaloproteinasas, un dominio tipo desintegrina y un motivo trombospondina tipo 1 (TS). La expresión de este gen podría estar asociada con varios procesos inflamatorios, así como con la inhibición de la angiogénesis, crecimiento normal, fertilidad y morfología (Clark *et al.*, 2000). Por ejemplo, ratones *-/-* para *Adamts9* no sobreviven más allá del día 12 de desarrollo embrionario debido a una incapacidad de desarrollar un cordón umbilical y placenta normales (Enomoto *et al.*, 2010; Nandadasa *et al.*, 2015).

En nuestro trabajo encontramos varios genes sub-expresados pertenecientes a la familia de transportadores de solutos (familia SLC). Estos se encuentran agrupados centralmente en el gráfico de interacciones (Figura 21). Esta es una gran familia de genes (más de 300) que codifican para diversas proteínas transportadoras de solutos. De interés particular es *SCL18A2* el cual codifica para una proteína transportadora del neurotransmisor monamina (Lawal y Krantz, 2013). Además de su función como neurotransmisor, las monoaminas han

sido identificadas en líquido folicular y oviductal de varias especies de mamíferos (Way *et al.* 2001) lo cual podría estar indicado que posee en eventos tempranos de reproducción, pero que aún es desconocido (Herlenius y Lagercrantz, 2001; Anitole-Misleh y Brown, 2004). Interesantemente, Tesfaye y colaboradores (2007), también encontró este y otros miembros de la familia SLC desregulado en embriones elongados derivados de clones comparados con los controles producidos.

Otros genes como el *TFPI2* (tissue factor pathway inhibitor 2; -2, 708) y *TSPAN5* (tetraspanin 5; -2,064) participan en la activación de la cascada de la coagulación asociada con la deciduación en humanos (Dominguez *et al.*, 2015). *MSX1* (MSH homeobox 1; -2,07) codifica una proteína que actúa como un represor transcripcional durante la inducción de interacciones célula a célula en embriones y se ha visto que es importante en el desarrollo embrionario normal (Shetty *et al.*, 1999; Dixon *et al.*, 2011).

Adicionalmente, algunos genes particulares, menos involucrados en la red de interacciones, son los que están localizados en la periferia, estos también podrían tener roles importantes en el desarrollo. Por ejemplo, *GSTM3* (glutathione S-transferase mu 3; -2,107) se encuentra altamente desregulado en los embriones bipartidos, este gen codifica una proteína glutatión-transferasa, la cual participa en la desintoxicación de productos del estrés oxidativo mediante la conjugación con glutatión (Campbell *et al.*, 1990). *DSE* (dermatan sulfate epimerase; -2,102) es un antígeno de rechazo a tumores involucrado en la remodelación de la matriz extracelular y contribuye al desarrollo embrionario y post natal normal y en la homeostasis de tejidos mediante la aseguración de la estabilidad de los tejidos y funciones de señalización (Sasatomi *et al.*, 2002). La disminución en la expresión de estos genes podría tener consecuencias en el crecimiento y supervivencia de los embriones ya que los mecanismos de detoxificación y crecimiento podrían verse afectados.

Interesantemente, la mayoría de los genes sobre-expresados ubicados centralmente en la red de interacciones, tienen funciones generales pero no existen datos disponibles en la literatura de su expresión en embriones tempranos al momento de la implantación. Sin embargo, resulta de particular interés la alta expresión de *FAIM3* (Fc fragment of IgM receptor). El producto de este gen codifica para inhibir la apoptosis inducida por FAS previniendo el procesamiento de *CASP8*, lo que podría ser indicativo de un mecanismo compensatorio de los embriones bipartidos para contrarrestar el efecto negativo de la bipartición en el estado de blastocisto.

De los datos discutidos anteriormente, estos resultados indican que posterior a la bipartición se produce un daño significativo reflejado en la expresión génica, lo cual podría afectar la capacidad de los embriones bipartidos de elongarse apropiadamente y posteriormente implantarse. Es de especial relevancia la sub-expresión observada en el eje de remodelación de los componentes de la matriz extracelular y de los transportadores de agua y solutos, esto es evidencia de la desregulación de los genes localizados centralmente en la red de interacciones. La sub-expresión de uno o varios de estos genes probablemente puede llevar a una cascada de eventos que eventualmente podría alterar la elongación y por ende, perjudicar la futura implantación del embrión. Aunque la mayoría de los datos se han reunido del proceso de decidualización en humanos, se puede especular que una situación similar podría ocurrir para esta función en otros mamíferos.

Efecto de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto sobre el potencial de desarrollo peri-implantatorio.

Se ha establecido que la morfología por sí sola no es un criterio adecuado para evaluar el potencial de desarrollo embrionario (Wrenzycki *et al.*, 2004). Durante el desarrollo embrionario temprano, la expresión de genes específicos en cada etapa del desarrollo promueve el avance del embrión desde un estadio al siguiente (Hamatani *et al.*, 2004). Por esta razón, la determinación de la abundancia relativa de ARNm de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano se considera un indicador apropiado para medir la calidad embrionaria (Wrenzycki *et al.*, 2004; Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010a; 2010b; 2013; Velásquez *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se evaluó la expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario, seleccionándose marcadores del MCI y del trofoblasto. Los patrones de expresión obtenidos en los demi-embriones D9 que lograron llevar a cabo un adecuado desarrollo a blastocisto al D13 fueron comparados con aquellos demi-embriones que no lo lograron. Dentro de los genes expresados en el MCI se evaluaron los marcadores de pluripotencia *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*. Por otra parte, los marcadores trofoblásticos estudiados fueron *TP1*, *EOMES*, *FGF4*, *CDX2* Y *TKDP1*. Similar a lo reportado por otros investigadores, en todos los demi-embriones se detectó la presencia de transcritos de todos los genes estudiados (Hall *et al.*, 2005; Degrelle *et al.*, 2005).

En un estudio realizado anteriormente, se logró reportar la cinética de expresión génica de varios marcadores importantes en el desarrollo embrionario, al día 7 y al día 17 de desarrollo en embriones producidos por fertilización *in vitro* y por clonación somática (*OCT4*, *NANOG*, *FGF4*, *EOMES* y *TP1*) (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010a).

No obstante, en este experimento se analizaron diferentes embriones para cada estadio de desarrollo. Otro punto importante es que al día 7, el análisis se realizó en pools de embriones por lo que es probable que se enmascaren los resultados debido a variabilidad individual de la expresión génica en el estadio de blastocisto. Al día 17 de desarrollo, se analizaron embriones que fueron transferidos a hembras receptoras, sin embargo, solo un porcentaje de los embriones transferidos fueron colectados en estadio filamentosos y analizado su patrón de expresión génica (Clones: 6/11 y FIV: 6/30). Probablemente, los embriones que no se desarrollaron hasta estadio filamentosos y que por tanto no fueron analizados, provenían de blastocitos no competentes. Sin embargo, las condiciones experimentales utilizadas (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010a) no permiten establecer un patrón de expresión génica en estadio de blastocisto que permita confirmar esta hipótesis. En función de probar dicha hipótesis, en el presente estudio se plantea como necesidad experimental el uso de un mismo embrión para estudiar la cinética de expresión durante la etapa peri-implantatoria. El carácter invasivo del análisis de expresión génica indujo a utilizar la técnica de bipartición para generar demi-embryones genéticamente similares, lo que permite el análisis de expresión génica en el estadio de blastocisto, mientras que el otro demi-embrión continúa su desarrollo.

Numerosos estudios han demostrado que la continuidad del desarrollo embrionario en ratones, más allá del estadio de blastocisto depende de la expresión de *OCT4* (Nichols *et al.*, 1998) y sus niveles determinan la diferenciación o no de las células madre embrionarias del MCI (Niwa *et al.*, 2000). Boiani y colaboradores en el año 2002 reportaron que la expresión de *OCT4* en embriones bovinos en estadio de blastocisto, no se restringe al MCI, pero además los niveles de proteína permanecen elevados en el TB, posiblemente por la activa proliferación de las células trofoblásticas durante este estadio de desarrollo (Kirchhof *et al.*, 2000). Sin embargo, otros autores sugieren que *OCT4* se expresa tanto en el MCI como en el trofoblasto y este patrón se mantiene hasta la etapa filamentosos (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2009).

En embriones producidos por transferencia nuclear somática, se ha visto que éstos presentan aberraciones en la expresión de *OCT4* (Boiani *et al.*, 2002) y por otra parte, también se ha demostrado que embriones clonados generados a partir de células con

mayores niveles de expresión de *OCT4* tienen mayores tasas de blastocistos, mayor número total de células y mayor capacidad de producir crías viables (Beyhan et al., 2007). Por tanto, la expresión de *OCT4* en todos los embriones producidos es un elemento positivo que sugiere una mayor capacidad de desarrollo *in vitro*. Sin embargo, en experimentos previos (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a), se observó que el incremento de la expresión de *OCT4* en blastocistos clonados podría ser desfavorable para la continuidad del desarrollo. En este trabajo la expresión de *OCT4* se mantuvo constante entre el estadio de blastocisto hasta el estadio filamentoso en embriones generados por FIV pero disminuyó drásticamente en embriones clonados (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a). Esta variación en el patrón de expresión de este marcador podría estar relacionada con las diferencias en las tasas de implantación y desarrollo entre embriones clonados y de FIV (10 y 50 %, respectivamente). En nuestro experimento, no se encontraron diferencias en la expresión de *OCT4* en demi-embryones D9 cuyas contrapartes continuaron el desarrollo o no hasta el D13 de cultivo *in vitro*. En base a esto podemos decir que la expresión de *OCT4* por sí sola no es suficiente para mantener un correcto desarrollo embrionario. Este resultado concuerda con lo reportado por Smith y colaboradores el año 2007, ya que ellos no encontraron diferencias significativas en la expresión de *OCT4* entre embriones producidos por transferencia nuclear somática, fecundación *in vitro* o producidos *in vivo*. Sin embargo, existen datos contradictorios, ya que los datos mostrados previamente muestran que la sobre-expresión de *OCT4* al estadio de blastocisto está correlacionado con una menor competencia embrionaria a largo plazo (Rodríguez-Alvarez et al., 2010; 2013; Moro et al., 2015).

Con respecto a *SOX2* y *NANOG*, estos marcadores se encuentran altamente expresados en el MCI en blastocistos de ratón (Chen, et al., 2010), humanos (Adjaye et al., 2005) y bovinos (Ozawa et al., 2012; Zhao et al., 2016), lo cual sugiere que estos genes comparten la misma función en estas tres especies. *SOX2* cumple un rol importante al mantener el estado pluripotente de las células madre de ratón, la ausencia de este marcador en estas células promueve la diferenciación a células similares a trofoblasto, lo cual sugiere que la expresión de *OCT4* va a depender de la activación mediada por *SOX2*. La proteína de *SOX2* se localiza exclusivamente en el MCI en blastocistos bovinos, y una disminución de su expresión afecta negativamente la etapa de pre-implantación (Goissis y Cibelli, 2014). Esto sugiere que la alta expresión de *SOX2* en el MCI es necesaria para mantener el estado indiferenciado de estas células. Por otra parte, la represión de *SOX2* promueve la expresión de genes marcadores del trofoblasto lo cual se potencia con la disminución paulatina de los niveles de *OCT4* debido a la ausencia de *SOX2*. Además, existen evidencias que indican

que la función que cumple *SOX2* sobre la activación de los marcadores de pluripotencia, puede ser remplazada por otros miembros de la familia *SOX*. Un ejemplo de esto es un estudio realizado en ratones, donde demostraron que además de *SOX2*, también pueden actuar sobre este sitio *SOX4*, *SOX11* y *SOX15* regulando la expresión de los genes antes mencionados (Masui *et al.*, 2007), esto demuestra que aún en ausencia de *SOX2*, es posible activar la expresión de *OCT4* y posiblemente de otros genes como *FGF4* y *NANOG*. En bovinos, durante el estadio de blastocisto, la expresión de *NANOG* se limita al MCI pero a medida que el embrión se elonga la activación de este gen también se extiende al TB (Degrelle *et al.*, 2005). Además juega un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de los diferentes linajes celulares.

En este experimento, se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de *SOX2* y *NANOG* en los demi-embriones D9 cuya contraparte no se desarrolló correctamente *in vitro*. Esto coincide con la correlación negativa que se observa entre la expresión *SOX2* en los demi-embriones al D9 de desarrollo y la sobrevivencia de sus contrapartes hasta el día 13. Esto está en concordancia con lo descrito por Yamaguchi y colaboradores (2011), donde se evaluó el efecto de *SOX2* en la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), como resultado se obtuvo que la transfección con *SOX2* en una dosis elevada resultaba en una disminución de la expresión de *OCT4* en estas células. Esto sugiere que una sobre-expresión de *SOX2* afecta la capacidad de reprogramación, por lo cual una correcta expresión de este gen pudiera ser esencial para inducir una reprogramación eficiente, y por ende generar iPSCs. Otros resultados similares fueron reportados por Pan y Schultz (2011), en este experimento realizaron microinyección de ARN complementario de *SOX2* a embriones de 1 célula para generar una sobre-expresión de este gen. Se observó que el 70% de los embriones microinyectados sobre-expresaban el gen y a su vez mostraron un arresto del desarrollo en el estadio de dos células. Esta sobre-expresión de *SOX2* generó una represión del 15% de los genes en los cigotos, lo que causó la detención del desarrollo. Recientemente, Moro y colaboradores (2015) describieron que blastocistos de gato producidos por transferencia nuclear somática presentan una sobre-expresión de los marcadores *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, y *CDX2* en comparación a blastocistos de gato producidos por fecundación *in vitro*. Esto es indicativo de que la técnica utilizada para la generación *in vitro* de estos embriones, afecta significativamente el patrón de expresión génica de estos, observándose variaciones en embriones generados por una técnica u otra. Otro estudio realizado reporta que embriones bovinos con bajo potencial de desarrollo

presentaron mayores tasas de transcripción de los marcadores de pluripotencia, existiendo un desequilibrio entre la expresión de estos genes. Esto genera un desarrollo “normal” *in vitro*, evaluado desde el punto de vista morfológico, pero probablemente esta sobre-expresión tiene efectos negativos en estadios posteriores, lo que se traduce en anomalías o detención del desarrollo a largo plazo (Khan *et al.*, 2012).

A raíz de los datos obtenidos en este trabajo y de la literatura se puede postular la hipótesis de que existe un umbral en la expresión de marcadores de pluripotencia, que al ser sobrepasado genera un efecto negativo para los embriones, lo que se traduce en una inhibición del desarrollo. Por otra parte, cuando esa expresión es muy baja, también se refleja en un desarrollo inadecuado. Los embriones que logran un buen desarrollo son aquellos que tienen una expresión génica estrictamente regulada y equilibrada. Al parecer la manipulación embrionaria induce una sobre-expresión de los marcadores de pluripotencia, probablemente como un mecanismo compensatorio que al final se traduce en un incorrecto desarrollo embrionario peri-implantatorio. Finalmente, una sobre-expresión de estos marcadores no es suficiente para predecir la continuidad de desarrollo, por lo que debe existir un nivel adecuado de expresión que garantice una buena diferenciación y funcionalidad del trofoblasto.

Con el objetivo de determinar las variaciones en la expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) a medida que avanza el desarrollo embrionario, se evaluaron los patrones de expresión de dichos genes, para ver los cambios que se producen entre los embriones en estadio de blastocisto y sus contrapartes al D13 de desarrollo. Ushisawa y colaboradores (2004), evaluaron la expresión génica diferencial entre blastocistos bovinos D7 y embriones elongados al D14 mediante un análisis de microarreglo. Se encontraron más de 500 genes sobre-expresados, y sólo 26 genes sub-expresados. Muchos de los genes sobre-expresados continuaron siendo expresados en etapas más tardías cercanas al momento de la implantación. La explicación más simple para este hallazgo es la creciente complejidad de los procesos biológicos a los que se enfrentan los embriones elongados y también por el aumento del número de células totales (Degrelle *et al.*, 2005). Se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de los tres marcadores de pluripotencia al D13 de desarrollo. Similar a lo reportado por Degrelle y colaboradores (2005), la expresión de *OCT4* es silenciada al final de la etapa de elongación. De los datos presentados, se concluye que hay una variación en la expresión de los genes estudiados en embriones bovinos en la transición blastulación-elongación.

Por otra parte, también se realizó un análisis de correlación entre la expresión de los marcadores de pluripotencia en el estadio de blastocisto y el diámetro alcanzado por las contrapartes de estos embriones al D13 de desarrollo, existiendo una correlación ($r=0,6$; $p=0,01$) entre la expresión de *OCT4* y el diámetro de los embriones. Esto concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado en embriones equinos, donde la expresión de todos los marcadores de pluripotencia estudiados (*OCT4*, *NANOG*, *DPPA4*, *GDF3* y *TERT*) fue mayor en los embriones con mayor diámetro (Paris *et al.*, 2008). Además, en un estudio en clones bovinos, Rodriguez-Alvarez y colaboradores (2013) también observaron una correlación positiva entre la expresión de *OCT4* en los blastocistos y el número total de células de estos ($r=0.98$; $p=0.002$), lo cual está en estrecha relación con el diámetro de los embriones.

Asimismo se realizó un estudio de correlación entre la expresión de los marcadores de pluripotencia en el estadio de blastocisto y la expresión de los marcadores trofoblásticos en las contrapartes al día 13 de desarrollo. Interferón tau (*TP1*) es una de las principales proteínas secretadas por el trofoblasto y es esencial para el reconocimiento y mantenimiento de la preñez temprana. *TP1* es expresado por las células mononucleadas del trofoblasto extra-embriónico primitivo, lo que posteriormente dará origen a la placenta en rumiantes (Farin *et al.*, 1989; Guillomot *et al.*, 1990). La expresión de este marcador es detectada durante la formación del blastocelo y continúa hasta la implantación en los días 25-28 de gestación y se ha visto que la máxima expresión de *TP1* se produce en los días inmediatos a la implantación (MacLean *et al.*, 2003). La expresión de *TP1* en todos los embriones producidos *in vitro* en este estudio confirma estudios anteriores donde se sugiere que la expresión de este gen no depende directamente de factores secretados por el ambiente uterino (Stojkovic *et al.*, 1995; Kubisch *et al.*, 2004). Además, en este experimento se observó una correlación positiva entre la expresión de *SOX2* y la expresión de *TP1* al D13 de desarrollo. Esto sugiere que un nivel adecuado de expresión de *SOX2* genera una mayor expresión de *TP1*, lo cual es esencial para un correcto reconocimiento materno-embriónico. Sin embargo, se han observado resultados contradictorios en investigaciones que correlacionan la calidad morfológica del embrión y la secreción de *TP1*. Se ha concluido que los embriones de mejor calidad expresan mayores niveles de *TP1*, especialmente en aquellos eclosionados (Stojkovic *et al.*, 1999). No obstante, Kubisch y colaboradores (1998) observaron que la secreción de *TP1* no depende de la calidad de los embriones, tras correlacionar esta expresión con el número total de células de los blastocistos producidos *in vitro*.

Finalmente, se observó una correlación entre la expresión de *NANOG* en estadio de blastocisto y la expresión de *EOMES* y *FGF4* al D13 de desarrollo. *NANOG*, al igual que *OCT4* es un factor de transcripción que mantiene el estado pluripotente de las células embrionarias y las células madre (Foygel *et al.*, 2008). Durante el estadio de blastocisto, la expresión de *NANOG* se limita al MCI pero a medida que el embrión se elonga la activación de este gen también se extiende al TB (Degrelle *et al.*, 2005). Se sabe que este gen al igual que *FGF4* juega un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de los diferentes linajes celulares. Se ha demostrado que la expresión de *NANOG* en embriones bovinos actúa como un inductor “upstream” (Degrelle *et al.*, 2005), y su expresión no es silenciada en las células del trofoblasto en embriones elongados en la fase más cercana a la implantación, sugiriendo un papel de *NANOG* en los eventos más tardíos del desarrollo peri-implantatorio. Los factores de pluripotencia generalmente se consideran inhibidores de la diferenciación, y en un experimento realizado por Teo y colaboradores (2011), sus resultados muestran que *NANOG* participa activamente en la diferenciación del endodermo promoviendo la expresión *EOMES*, lo cual concuerda con nuestros resultados. Por tanto, una correcta expresión de *NANOG* en estadio pre-implantatorio, promueve una correcta expresión de marcadores que son esenciales para la continuidad de desarrollo peri-implantatorio.

Como resultado global de esta tesis, la bipartición de embriones bovinos producidos *in vitro* en estadio de blastocisto no fue suficiente para validar la expresión de marcadores de pluripotencia como predictores de la capacidad de desarrollo embrionario hasta el estadio peri-implantatorio. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que existe un umbral en la expresión de marcadores de pluripotencia, que al ser sobrepasado genera un efecto negativo para el desarrollo, afectando la calidad del embrión durante la etapa peri-implantatoria. La expresión de estos marcadores se correlaciona positivamente con un buen crecimiento embrionario y una buena diferenciación trofoblástica. Adicionalmente, el análisis de la relación de la expresión de *SOX2* y *OCT4* indica que estos genes deberían expresarse en una proporción similar para garantizar el éxito del desarrollo embrionario en bovinos. Se sugiere profundizar en el estudio del impacto de la expresión de estos marcadores sobre el desarrollo embrionario a través de experimentos que involucren la sobre-expresión o silenciamiento individual de cada marcador y su correlación con la capacidad de desarrollo hasta estadios más avanzados, especialmente posterior a la implantación.

5. CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo de bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro*, generando demi-embryones viables.

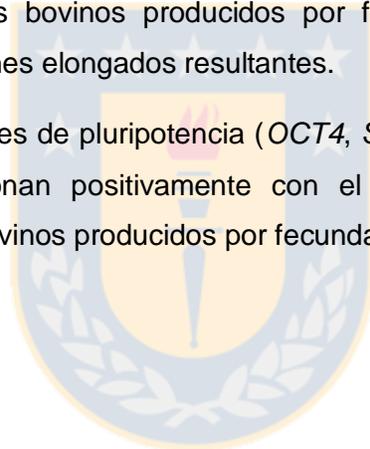
La bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro* genera demi-embryones al D9 con características morfológicas y moleculares similares.

La bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro* genera demi-embryones al D13 con características morfológicas y moleculares diferentes.

La bipartición de embryones bovinos *in vitro* genera demi-embryones capaces de expandirse *in vitro* y de elongarse *in vivo*.

La bipartición de blastocistos bovinos producidos por fecundación *in vitro*, afecta la transcriptómica de los embryones elongados resultantes.

La expresión de los marcadores de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) en estadio de blastocisto, no se correlacionan positivamente con el potencial de desarrollo peri-implantatorio de embryones bovinos producidos por fecundación *in vitro*.



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T. and Hoshi, H. (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev.* 53(3): 325-35.
2. Abolfazl, S., Sara, B., Hassan, N., Ebrahim, A., Banafsheh, H., Amin, B. (2010). Effects of timing on cell biopsy from pre-compacted morula stage bovine embryos on subsequent embryonic development. *J Reprod Infertil.* 11, 25-32.
3. Adjaye, J. (2005). Whole-genome approaches for large-scale gene identification and expression analysis in mammalian preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev.* 17(1-2), 37-45.
4. Adjaye, J., Herwig, R., Herrmann, D., Wruck, W., Benkahla, A., Brink, T.C., Nowak, M., Carnwath, J.W., Hultschig, C., Niemann, H., Lehrach, H. (2004). Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. *BMC Genomics.* 5, 83.
5. Akagi, S., Matsukawa, K. and Takahashi, S. (2014). Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in Cattle. *J Reprod Dev.* 60(5): 329-35.
6. Albiñ, A., Rodriguez-Martinez, H., Gustafsson, H. (1990). Morphology of day 7 bovine demi-embryos during *in vitro* reorganization. *Acta Anat (Basel).* 138, 42-9.
7. Alexopoulos, N.I., French, A.J. (2009). The prevalence of embryonic remnants following the recovery of post-hatching bovine embryos produced *in vitro* or by somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci.* 114, 43-53.
8. Alizadeh, Z., Kageyama, S.I., Aoki, F. (2005). Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: Selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 281–290.
9. Anitole-Misleh, K.G., and Brown, K.M. (2004). Developmental regulation of catecholamine levels during sea urchin embryo morphogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 137, 39-50.

10. Ao, A., Monk, M., Lovell-Badge, R. and Melton, D.W. (1988). Expression of injected HPRT minigene DNA in mouse embryos and its inhibition by antisense DNA. *Development*. 104(3): 465-71.
11. Aoki, F., Worrada, D.M., Schultz, R.M. (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 181, 296-307.
12. Arav, A. (2001). Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology* 55(7), 1561-1565.
13. Arnold, D.R., Bordignon, V., Lefebvre, R., Murphy, B.D., Smith, L.C. (2006). Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*. 132, 279-90.
14. Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17(1), 126-140.
15. Azadbakht, M., Valojerdi, M.R. (2008). Development of vitrified-warmed mouse embryos co-cultured with polarized or non-polarized uterine epithelial cells using sequential culture media. *J Assist Reprod Genet.* 25(6), 251–261.
16. Bachvarova, R., De Leon, V. (1980). Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev. Biol.* 74, 1–8.
17. Bakhtari, A., Ross, P.J. (2014). DPPA3 prevents cytosine hydroxymethylation of the maternal pronucleus and is required for normal development in bovine embryos. *Epigenetics*. 9(9): 1271-1279.
18. Baroux C., Autran, D., Gillmor, C.S., Grimanelli, D., Grossniklaus, U. (2008). The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 89-100.
19. Bavister, B.D. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*. Mar; 1(2): 91-148. Review.
20. Bazer, F.W, Wu, G., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C. and Bayless, K. (2010). Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod.* 16(3): 135–152.

21. Bazer, F.W. (1975). Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci.* 41: 1376–1382.
22. Bazer, F.W., Spencer, T.E., Ott, T.L. (1997). Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol.* 37, 412-20.
23. Bell, C.E., Calder, M.D., Watson, A.J. (2008). Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 691–701.
24. Bensaude, O., Babinet, C., Morange, M., Jacob, F. (1983). Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature.* 305, 331-333.
25. Bertolini, M., Beam, S.W., Shim, H., Bertolini, L.R., Moyer, A.L., Famula, T.R., and Anderson, G.B. (2002). Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 318-328.
26. Betsha, S., Hoelker, M., Salilew-Wondim, D., Held, E., Rings, F., Grosse-Brinkhause, C., Cinar, M.U., Havlicek, V., Besenfelder, U., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., and Tesfaye, D. (2013). Transcriptome profile of bovine elongated conceptus obtained from SCNT and IVP pregnancies. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 315-333.
27. Beyhan, Z., Forsberg, E.J., Eilertsen, K.J., Kent-First, M., First, N.L. (2007). Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Mol Reprod Dev.* 74, 18-27.
28. Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol.* 95(2): 317-24.
29. Blomberg, L., Hashizume, K., and Viebahn, C. (2008). Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction.* 135, 181-195.
30. Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F. and Sirard, M.A. (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod.* 66, 38–43.
31. Blondin, P., Farin, P.W., Crosier, A.E., Lexander, J.E. and Farin, C.E. (2000). *In vitro* production of embryos alters levels of IGF-II mRNA in bovine fetuses 63 days after transfer. *Biol Reprod.* 62, 384-389.

32. Boiani, M., Eckardt, S., Schöler, H.R., and McLaughlin, K.J. (2002). *OCT4* distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16, 1209-1219.
33. Boland, M.P. (1984). Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology.* 21, 127-137.
34. Brackett, B.G. Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27, 147-158.
35. Brandao D.O., Hyttel, P., Lovendahl, P., Rumpf, R., Stringfellow, D., Callesen, H. (2004). Post hatching development: A novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. *Biol Reprod.* 71, 2048-2055.
36. Braude, P., Bolton, V., Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 332, 459-461.
37. Bredbacka, P., Huhtinen, M., Aalto, J., and Rainio, V. (1992). Viability of bovine demi- and quarter-embryos after transfer. *Theriogenology.* 38, 107-113.
38. Bredbacka, P., Kankaanpä, A., Peippo, J. (1995). PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology.* 44, 167-176.
39. Bredbacka, P., Velmala, R., Peippo, J., Bredbacka, K. (1994). Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos. *Theriogenology.* 41, 1023-31.
40. Breed WG, Hope RM, Wiebkin OW, Spargo SC, Chapman JA. (2002). Structural organization and evolution of the marsupial zona pellucida. *Reproduction.* 123(1), 13-21.
41. Brem, G., Tenhumberg, H., and Kräußlich, H. (1984). Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae. *Theriogenology.* 22, 609-613.
42. Brenner, C.A., Adler, R.R., Rappolee, D.A., Pedersen, R.A., and Werb, Z. (1989). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* 3(6), 848-859.
43. Brevini, T.A., Lonergan, P., Cillo, F., Francisci, C., Favetta, L.A., Fair, T., Gandolfi, F. (2002). Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 510-517.

44. Burns, K.H., Viveiros, M.M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F.J., Frail, D.E., Eppig, J.J., Matzuk, M.M. (2003). Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science*. 300(5619), 633-636.
45. Campbell, E., Takahashi, Y., Abramovitz, M., Peretz, M., and Listowsky, I. (1990). A distinct human testis and brain mu-class glutathione S-transferase. Molecular cloning and characterization of a form present even in individuals lacking hepatic type mu isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 265, 9188-9193.
46. Capalbo, A., Bono, S., Spizzichino, L. (2013). Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Human Reproduction*. 28(2), 509–518.
47. Chang, M. (1948). The effects of low temperature on fertilized rabbit ova *in vitro*, and the normal development of ova kept at low temperature for several days. *J Gen Physiol*. 31, 385–410
48. Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J.P., Créminon, C., Guillomot, M. (1997). Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol Reprod*. 57, 1032-40.
49. Chatzimeletiou, K., Morrison, E.E., Panagiotidis, Y., Prapas, N., Prapas, Y., Rutherford, A.J., Grudzinskas, G. and Handyside, A.H. (2005). Comparison of effects of zona drilling by non-contact infrared laser or acid Tyrode's on the development of human biopsied embryos as revealed by blastomere viability, cytoskeletal analysis and molecular cytogenetics. *Reprod Biomed Online*. 11(6): 697-710.
50. Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L., Daley, G.Q. (2010). Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res*. 20, 982–993.
51. Cho, H.J., Son, W.Y., Yoon, S.H., Lee, S.W., Lim, J.H. (2002). An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*. 17, 2419–2422.
52. Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. (1998). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat. Biotech*. 16, 642-646.

53. Cimadomo, D., Capalbo, A., Ubaldi, F.M., Scarica, C., Palagiano, A., Canipari, R. and Rienzi, L. (2016). The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int.* 2016: 7193075.
54. Clark, M.E., Kelner, G.S., Turbeville, L.A., Boyer, A., Arden, K.C., and Maki, R.A. (2000). ADAMTS9, a novel member of the ADAM-TS/ metallospodin gene family. *Genomics.* 67, 343-350.
55. Clegg, K.B., Piko, L. (1982). RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature.* 295, 342-345.
56. Clemente, M., de La Fuente, J., Fair, T., Al Naib, A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J.F., Rizos, D., and Lonergan, P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction.* 138, 507-517.
57. Clemente, M., Lopez-Vidriero, I., O'Garra, P., Mehta, J.P., Forde, N., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., Rizos, D. (2011). Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biol Reprod* 85, 285-295.
58. Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Massey, J., Mayer, M. P. (1990). Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertility and Sterility.* 53(4), 662–665.
59. Conover, J.C., Temeles, G.L., Zimmerman, J.W., Burke, B., Schultz, R.M. (1991). Stage-specific expression of a family of proteins that are major products of zygotic genome activation in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 144, 392-404.
60. Crister, E.S., Leibfried-Rutledge, M.L., Eyestone, W.H., Northey, D.L. and First, N.L. (1986). Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology.* 25, 150.
61. Crosier, A.E., Farin, C.E., Rodriguez, K.F., Blondin, P., Alexander, J.E., Farin, P.W. (2002). Development of skeletal muscle and expression of candidate genes in bovine fetuses from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod.* 67(2), 401-408.
62. Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., Farin, C.E. (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod.* 62, 1459-1465.

63. Cross, J.C. (2005). How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - a review. *Placenta*. 26, S3-S9.
64. Damsky, C.H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K., Buck, C.A. (1983). Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell*. 34(2), 455-466.
65. Das, C., Kumar, V.S., Gupta, S., and Kumar, S. (2002). Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 53, 257-268.
66. de Boer, K.A., Catt, J.W., Jansen, R.P.S., Leigh, D., McArthur, S. (2004). Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertility and Sterility*. 82(2), 295-298.
67. de Rycke, M., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. (2002). Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod.* 17(10), 2487-2494.
68. de Vos, A. van Steirteghem, A.C. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 21(9), 767-80.
69. Degrelle, S.A., Champion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., et al. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev Biol*. 288, 448-60.
70. Depypere, H.T., J.C. Carroll, D. Vandekerckhove, and Matthews, C.D. (1991). Normal survival and in-vitro development after cryopreservation of zona-drilled embryos in mice. *Human reproduction*. 6(3), 432-435.
71. Desmyttere, S., De Rycke, M., Staessen, C., Liebaers, I., De Schrijver, F., Verpoest, W., Haentjens, P., Bonduelle, M. (2012). Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD. *Hum Reprod*. 27(1), 288-293.
72. Dietl, J. (1986). Zona pellucida of the mammalian egg: unique extracellular matrix. *Naturwissenschaften*. 73(2), 89-94.
73. Diskin, M.G., and Morris, D.G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest. Anim.* 43, 260-267.

74. Dixon, M.J., Marazita, M.L., Beaty, T.H., and Murray, J.C. (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 12, 167-178.
75. Dominguez, F., Meseguer, M., Aparicio-Ruiz, B., Piqueras, P., Quiñonero, A., and Simón, C. (2015). New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil. Steril.* 104, 908-914.
76. Dorniak, P., Welsh, T.H.Jr., Bazer, F.W., Spencer, T.E. (2013). Cortisol and interferon tau regulation of endometrial function and conceptus development in female sheep. *Endocrinology.* 154(2), 931-941.
77. Downs, S.M., Daniel, S.A., Bornslaeger, E.A., Hoppe, P.C., and Eppig, J.J. (1989). Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res.* 23(3), 323-334.
78. Dumoulin, J.C., Bras, M., Coonen, E., Dreesen, J., Geraedts, J. P., Evers, J.L. (1998). Effect of Ca²⁺/Mg²⁺-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Human Reproduction.* 13(10), 2880–2883.
79. Eckert, J.J., Fleming, T.P. (2008). Tight junction biogenesis during early development. *Biochim Biophys Acta.* 1778, 717–728.
80. Edwards, R.G. (1965). Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet.* 2:926-929.
81. Eldar-Geva, T., Srebnik, N., Altarescu, G. (2014). Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 102(4), 1016–1021.
82. El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., et al. (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics.* 28, 84-96.
83. Enomoto, H., Nelson, C.M., Somerville, R.P., Mielke, K., Dixon, L.J., Powell, K., and Apte, S.S. (2010). Cooperation of two ADAMTS metalloproteases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. *Development.* 137, 4029-4038.

84. Eyestone, W.H., Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L., Gilligan, B.G., First, N.L. (1987). Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*. 28(1), 1-7.
85. Farin, C.E., Imakawa, K., Roberts, R.M. (1989). In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Mol Endocrinol*. 3, 1099–1107.
86. Feichtinger, W., Strohmer, H., Fuhrberg, P. (1992). Photoablation of oocyte zona pellucida by erbium-YAG laser for in-vitro fertilisation in severe male infertility. *The Lancet*. 339(8796), 811.
87. Ferguson, E.M., Leese, H.J. (1999). Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil*. 116(2), 373-378.
88. Flach, G., Johnson, M.H., Braude, P.R., Taylor, R.A., Bolton, V.N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J*. 1, 681–686.
89. Foote, R.H. (1975). Estrus detection and estrus detection aids. *J.Dairy Sci*. 58, 248.
90. Forman, E.J., Li, X., Ferry, K.M., Scott, K., Treff, N.R., Scott, R.T. (2012). Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril*. 98, 644-649.
91. Foygel, K., Choi, B., Jun, S., Leong, D.E., Lee, A., Wong, C.C., Zuo, E., Eckart, M., Reijo, R.A., Wong, W.H., and Yao, M.W.M. (2008). A novel and critical role for *Aspm* as a regulator of the maternal-embryonic transition. *PLoS One*. 3, e4109.
92. Freour, T., Lammers, J., Spingart, C., Jean, M., Barriere, P. (2012). Time lapse (Embryoscope®) as a routine technique in the IVF laboratory: a useful tool for better embryo selection? *Gynecol Obstet Fertil*. 40(9), 476-80.
93. Fulka, H., St. John, J.C., Fulka, J., Hozak, P. (2008). Chromatin in early mammalian embryos: achieving the pluripotent state. *Differentiation*. 76, 3–14.
94. Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., Held, E., Dufort, I., Sirard, M.A., Schellander, K., Tesfaye, D. (2012). Molecular mechanisms and

pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. Biol Reprod. 87, 100.

95. Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. Theriogenology. 59(2), 599-616.

96. Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P., Odde, K.G. (1996). Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenolog. 45, 141–152.

97. Geisert, R.D., Malayer, J.R. (2002). Implantación. E. Hafez y B. Hafez (Eds.). Reproducción e inseminación artificial en animales. (7a. ed.). McGraw-Hill Interamericana. pp: 129-135.

98. Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. Reprod Domest Anim. 37(3), 133-139.

99. Goff, A.K., Smith, L.C. (1998). Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. Theriogenology. 49(5), 1021-1030.

100. Goissis, M.D., Cibelli, J.B. (2014). Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. Biol Reprod. 13;90(2), 30.

101. Gordon, I. (2003). *In vitro* Fertilization. En: Gordon I (eds). Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Inglaterra, CABI Publishing pp. 176-219.

102. Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y., Ogawa, K. (1988). Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. J Reprod Fertil. 83(2), 753-8.

103. Gray, C.A., Taylor, K.M., Ramsey, W.S., Hill, J.R., Bazer, F.W., Bartol, F.F., Spencer, T.E. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. Biol Reprod. 64(6), 1608–1613.

104. Guerin, J.F., Merviel, P., Plachot, M. (1997). Influence of co-culture with established human endometrial epithelial and stromal cell lines on sperm movement characteristics. Hum Reprod. 12(6), 1197-202.

105. Guillemot, F., Caspary, T., Tilghman, S.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Anderson, D.J., Joyner, A.L., Rossant, J., Nagy, A. (1995). Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. Nat Genet. 9(3), 235-42.

106. Guillomot, M., Michel, C., Gaye, P., Charlier, N., Trojan, J., Martal, J. (1990). Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. *Biol. Cell.* 68, 205–211.
107. Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell.* 18, 675–685.
108. Gurdon, J.B. (1974). Molecular biology in a living cell. *Nature.* 248, 772-776.
109. Hall, V.J., Ruddock, N.T., French, A.J. (2005). Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 72(1), 16-24.
110. Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., Ko, M.S. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell.* 6(1), 117-131.
111. Hansen, P.J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Theriogenology.* 65(1), 119-125.
112. Hansen, P.J., Aréchiga, C.F. (1999). Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J Anim Sci.* 77 Suppl 2, 36-50.
113. Hashiyada, Y., Okada, M., Imai, K. (2005). Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from *in vivo*-cultured *in vitro*-fertilized embryos. *J Reprod Dev.* 51(6), 749-756.
114. Hendriksen P.J., Vos, P.L., Steenweg, W.N., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. (2000). Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenol.* 53, 11-20.
115. Herlenius, E., Lagercrantz, H. (2001). Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Hum Dev.* 65, 21-37.
116. Herman, H.A., Mitchell, J.R., Doak, G.A. (1994). Frozen semen, cryogenic storage, transportation and handling. In *Artificial insemination and embryo transfer: a handbook and laboratory manual* 8th edition. 117–139.
117. Herr, C.M., Matthaai K.I., Petrzak K.V. and Reed K.C. (1990). A rapid Y chromosome-detecting ovine embryo sexing assay. *Theriogenology* 33, 245.

118. Herr, C.M., Reed, K.C. (1991). Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*. 35(1), 45–54.
119. Herrler, A., Beier, H.M. (2000). Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs*. 166, 233–246.
120. Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., Berthelot, V., Fromentin, G., Hocquette, J.F., Martignat, L., Renard, J.P. (2007). Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology*. 1, 67(1), 134-41.
121. Heyman, Y., Vignon, X., Chesné, P., Le Bourhis, D., Marchal, J., Renard, J.P. (1998). Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. *Reprod Nutr Dev*, 38, 595-603.
122. Hochedlinger, K., Jaenisch, R. (2003). Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med*. 349, 275-286
123. Hoelker, M., Schmoll, F., Schneider, H., Rings, F., Gilles, M., Tesfaye, D., Jennen, D., Tholen, E., Griese, J., and Schellander, K. (2006). Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reprod. Fertil. Dev*. 18, 551-557.
124. 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, e4142.
125. Huang, X., Hao, C., Shen, X., Zhang, Y., and Liu, X. (2013). RUNX2, GPX3 and PTX3 gene expression profiling in cumulus cells are reflective oocyte/embryo competence and potentially reliable predictors of embryo developmental competence in PCOS patients. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 11, 109.
126. Hue, I., Degrelle, S.A., Champion, E. & Renard, J.P. (2007). Gene expression in elongating and gastrulating embryos from ruminants. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 64, 365–377.
127. Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinge, K., Rideout W.M., Biniszkiwicz, D., Yanagimachi, R. and Jaenisch, R. (2001). Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*. 293: 95-97.

128. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park, E.S., Lee, E.G., Koo, J.M., Jeon, H.Y., Lee, B.C., Kang, S.K., Kim, S.J., Ahn, C., Hwang, J.H., Park, K.Y., Cibelli, J.C. and Moon, S.Y. (2004). Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*. 303(5664): 1669-1967.
129. Illmensee, K., Levanduski, M., Vidali, A., Husami, N., Goudas, V.T. (2010). Human embryo twinning with applications in reproductive medicine. *Fertil Steril*. 93, 423-7.
130. Imakawa, K., Chang, K.T., Christenson, R.K. (2004). Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *J Reprod Dev* 50, 155-169.
131. Jaeger, L.A., Spiegel, A.K., Ing, N.H., Johnson, G.A., Bazer, F.W., and Burghardt, R.C. (2005). Functional effects of transforming growth factor beta on adhesive properties of porcine trophectoderm. *Endocrinology*. 146, 3933-3942.
132. Keefer, C.L., Pant, D., Blomberg, L., and Talbot, N.C. (2007). Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 98(1-2), 147-168.
133. Khan, D.R., 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.
134. Kim, J.G., Rohrer, G., Nonneman, D., and Vallet, J.L. (2010). Molecular Cloning of Porcine Chemokine CXC Motif Ligand 2 (CXCL2) and Mapping to the SSC8. *Biol. Reprod.* 83, 79 (abstract: 351).
135. Kirchhof, N., Carnwath, J.W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H., Niemann, H. (2000). Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod.* 63(6), 1698-1705.
136. Kirkegaard, K., Hindkjaer, J.J., Ingerslev, H.J. (2012). Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis. *Hum Reprod.* 27, 97-105.
137. Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Einspanier, R., Meyer, H.H., Schmidt, S.E., Reichenbach, H.D., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E. (2006). Monozygotic

twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod.* 74, 253-64.

138. Klisch, K., Hecht, W., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B., Leiser, R. (1999). DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta.* 20, 451-8.

139. Ko, M.S.H. (2004). Embryogenomics of preimplantation mammalian development: current status. *Reprod. Fert. Dev.* 16, 79–85.

140. Kovacs, P. (2014). Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol.* 15(12), 124.

141. Kubisch, H.M., Larson, M.A., Roberts, R.M. (1998). Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by *in vitro*-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 49(3), 254-260.

142. Kubisch, H.M., Sirisathien, S., Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H., Clements, G., Liukkonen, J., Brackett, B. (2004). Effects of developmental stage, embryonic interferon-tau and recipient synchrony on pregnancy rate after transfer of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim.* 39, 120–124.

143. Kuijk, E.W., Du Puy, L., Van Tol, H.T.A., Oei, C.H.Y., Haagsman, H.P. (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. *Developmental Dynamics.* 237, 918–927.

144. Kulesh, D.A., Clive, D.R., Zarlenga, D.S., Greene, J.J. (1987). Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84, 8453-7.

145. Landsberger, N., Wolffe, A.P. (1995). Chromatin and transcriptional activity in early *Xenopus* development. *Semin. Cell Biol.* 6, 191-199.

146. Lashkari, D.A., DeRisi, J.L., McCusker, J.H., Namath, A.F., Gentile, C., Hwang, S.Y., Brown, P.O., Davis, R.W. (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 13057-13062.

147. Latchman, D.S. (1999). POU family transcription factors in the nervous system. *J Cell Physiol.* 179(2), 126-33.

148. Latham, K. E., Schultz, R.M. (2001). Embryonic genome activation. *Front. Biosci.* 6, 748-759.
149. Latham, K.E., Solter, D., Schultz, R.M. (1991). Activation of a two-cell stage-specific gene following transfer of heterologous nuclei into enucleated mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 30(3), 182-6.
150. Lawal, H.O., and Krantz, D.E. (2013). SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol Aspects Med.* 34, 360-372.
151. Lechniak, D., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P. (2008). Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol.* 8(1), 23-42.
152. Lechniak, D., Warzych, E., Pers-Kamczyc, E., Sosnowski, J., Antosik, P., Rubes, J. (2007). Gilts and sows produce similar rate of diploid oocytes *in vitro* whereas the incidence of aneuploidy differs significantly. *Theriogenology.* 68(5), 755-62.
153. Leibfried, L., First, N.L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci.* 48(1), 76-86.
154. Levin, I., Almog, B., Shwartz, T., Gold, V., Ben-Yosef, D., Shaubi, M., Amit, A., Malcov, M. (2012). Effects of laser polar-body biopsy on embryo quality. *Fertil Steril.* 97(5), 1085-8.
155. Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662-673.
156. Li, L., Zheng, P., Dean, J. (2010). Maternal control of early mouse development. *Development.* 137, 859–870.
157. Liebaers, I., Desmyttere, S., Verpoest, W., De Rycke, M., Staessen, C., Sermon, K., Devroey, P., Haentjens, P., Bonduelle, M. (2010). Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 25(1), 275-82.
158. Lonergan, P., Fair, T. (2008). *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology.* 69:17-22.
159. Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P. and Boland, M.P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental

characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. J Reprod Fertil. Sep; 117(1): 159-67.

160. Lonergan, P., Pedersen, H.G., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, P.D., Fair, T., Evans, A., Boland, M.P. (2004). Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. Biol Reprod. 71(4), 1096-100.

161. Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T. and Boland, M.P. (2003). Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod Domest Anim. (4):259-67.

162. Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adán, A., Moreira, P.M., Pintado, B., de la Fuente, J., and Boland, M.P. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod. 69, 1424-1431.

163. Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. Reprod Nutr Dev. 41(5), 427-37.

164. Lopera-Vásquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., Calle, A., Redruello, A., López-Martín, S., Gutierrez-Adán, A., Yañez-Mó, M., Ramirez, M.Á., Rizos, D. (2016). Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality. PLoS One. 11(2), e0148083.

165. Machado, G.M., Caixeta, E.S., Lucci, C.M., Rumpf, R., Franco, M.M., Dode, M.A.N. (2012). Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: The effects of tunnel preparation and gender. Zygote. 20, 123-134.

166. Machado, G.M., Ferreira, A.R., Pivato, I., Fidelis, A., Spricigo, J.F., Paulini, F., Lucci, C.M., Franco, M.M., and Dode M.A. (2013). Post-hatching development of *in vitro* bovine embryos from day 7 to 14 *in vivo* versus *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 80, 936-947.

167. MacLean II, J.A., Chakrabarty, A., Xie, S., Bixby, J.A., Roberts, R.M., Green, J.A. (2003). Family of Kunitz proteins from trophoblast: expression of the trophoblast Kunitz domain proteins (TKDP) in cattle and sheep. Mol. Reprod. Dev. 65, 30-40.

168. Maddox-Hyttel, P., Alexopoulos, N.I., Vajta, G., Lewis, I., Rogers, P., Cann, L., Callensen, H., Tveden-Nyborg, P., and Trounson, A. (2003). Immunohistochemical and

ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*. 125, 607-623.

169. Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Toschi, M., Esposito, F. and Fasolino, M.C. (2004). The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod* 19: 1163-1169.

170. Maleszewski, M., Kimura, Y., Yanagimachi, R. (1996). Sperm membrane incorporation into oolema contributes to the oolemma block to sperm penetration: evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 256-259.

171. Malter, H. E., Cohen, J. (1989). Blastocyst formation and hatching *in vitro* following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Research*. 24(1): 67–80.

172. Malter, M.E., Cohen, J. (1987). Blastocyst formation and hatching *in vitro* following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res.* 24, 67–80.

173. Mamo, S., Mehta, J.P., McGettigan, P., Fair, T., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Lonergan, P. (2011). RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptus associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. *Biol Reprod.* 85, 1143-1151.

174. Marikawa, Y., Alarcón, V.B. (2009). Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* 76, 1019–1032.

175. Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K. (2007). Pluripotency governed by *SOX2* via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 9(6), 625–635.

176. McArthur, S. J., Leigh, D., Marshall, J. T., De Boer, K. A. and Jansen, R. P. (2005). Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertility and Sterility.* 84(6):1628–1636.

177. McEvoy, T. (2003). Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod Domest Anim.* 38: 268-275.

178. McEvoy, T.G., and Sreenan, J.M. (1990). The efficiency of production, centrifugation, microinjection and transfer of one- and two-cell bovine ova in a gene transfer program. *Theriogenology.* 33, 819-828.

179. McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Sinclair, K.D. (2001). Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction*. 122(4), 507-18.
180. McEvoy, T.G., Sinclair, K.D., Broadbent, P.J., Goodhand, K.L., Robinson, J.J. (1998). Post-natal growth and development of Simmental calves derived from *in vivo* or *in vitro* embryos. *Reprod Fertil Dev*. 10(6), 459-64.
181. Meirelles, F.V., Caetano, A.R., Watanabe, Y.F., Ripamonte, P., Carambula, S.F., Merighe, G.K., Garcia, S.M. (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 13-20.
182. Menezo, Y.J. (2006). Paternos y maternos factores en la embriogénesis de preimplantación: interacción con el entorno bioquímico. *Reprod Biomed línea*. 12 (5): 616-21.
183. Mertes, P.C., and Bondioli, K.R. (1985). Effect of splitting technique on pregnancy rate from half embryos. *Theriogenology*. 23, 209
184. Mio, Y., Maeda, K. (2008). Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*. 199: 660.e1–660.e5.
185. Moawad, A.R., Zhu, J., Choi, I., Amarnath, D., Chen, W. and Campbell, K.H. (2013). Production of good-quality blastocyst embryos following IVF of ovine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage using a cryoloop. *Reprod Fert Develop*. 25: 1204–1215.
186. Montag, M., van der Ven, K., Rösing, B. and van der Ven H. (2009). Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. *Reproductive BioMedicine Online*. 18(1):6–11.
187. Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet*. 14, R47–R58.
188. Moro, L.N., Hiriart, M.I., Buemo, C., Jarazo, J., Sestelo, A., Veraguas, D., Rodriguez-Alvarez, L.I., Salamone, D.F. (2015). Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene expression. *Reproduction*. 150(1), 1-10.
189. Morris, D., Diskin, M., and Sreenan, J. (2000). Protein synthesis and phosphorylation by elongating 13-15-day-old cattle blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev*. 12(1-2), 39-44.

190. Nagashima, H., Matsui, K., Sawasaki, T., Kano, Y. (1984). Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J Reprod Fertil.* 70(1), 357-62.
191. Nandadasa, S., Nelson, C.M., and Apte, S.S. (2015). ADAMTS9-mediated extracellular matrix dynamics regulates umbilical cord vascular smooth muscle differentiation and rotation. *Cell Rep.* 11, 1519-1528.
192. Nicholas, F.W., Smith, C. (1983). Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Animal Science.* 36(3), 341-353.
193. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *OCT4*. *Cell.* 95(3), 379-391.
194. Niemann, H., Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenol.* 53, 21-34.
195. Niwa, H., Miyazaki, J., Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Klewe-Nebenius, D., et al. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24, 372-6.
196. Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and *CDX2* determines trophectoderm differentiation. *Cell.* 2;123(5), 917-29.
197. Noden, D.M., De Lahunta, A. (1985). In: Noden DM, De Lahunta A (eds.): *The Embryology of Domestic Animals – Developmental Mechanisms and Malformations.* Williams & Wilkins, Baltimore. 156–195.
198. Noden, D.M., de Lahunta, A. (1990). Estadios iniciales del desarrollo en aves y mamíferos. *Embriología de los animales domésticos: mecanismos de desarrollo y malformaciones.* pp: 27-51.
199. Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1, 1559-1582.
200. Nothias, J.Y., Majumder, S., Kaneko, K.J., DePamphilis, M.L. (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem.* 22;270(38), 22077-80.

201. Nuwaysir, E.F., Huang, W., Albert, T.J., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., Richmond, T., Gorski, T., Berg, J.P., Ballin, J., McCormick, M., Norton, J., Pollock, T., Sumwalt, T., Butcher, L., Porter, D., Molla, M., Hall, C., Blattner, F., Sussman, M.R., Wallace, R.L., Cerrina, F., Green, R.D. (2002). Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Res.* 12(11), 1749-55.
202. Oback, B., Wells, D.N. (2007). Cloning cattle: the methods in the madness. *Adv Exp Med Biol.* 591: 30–57.
203. Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell.* 60, 461-472.
204. Oktay, K., Cil, A.P. and Bang, H. (2006). Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 2006, 86: 70–80 9.
205. Ozawa, M., Sakatani, M., Yao, J., Shanker, S., Yu, F., Yamashita, R., Wakabayashi, S., Nakai, K., Dobbs, K.B., Sudano, M.J., Farmerie, W.G., Hansen, P.J. (2012). Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Dev Biol.* 12, 33. doi: 10.1186/1471-213X-12-33.
206. Ozil, J.P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 69, 463-468.
207. Ozil, J.P., Heyman, Y., and Renard, J.P. (1982). Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec.* 110, 126-127.
208. Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., Scholer, H.R. (1991). Transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first 2 extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166, 259–267.
209. Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., Scholer, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extra embryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol.* 166, 259-267.
210. Pan, H., Schultz, R.M. (2011). SOX2 modulates reprogramming of gene expression in two-cell mouse embryos. *Biol. Reprod.* 85, 409–416.
211. Paris, D., Kuijk, E., Roelen, B., Stout, T. (2008). 284 Developmental changes in expression of pluripotent genes in early equine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 239–239.

212. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozenthawed semen. *Theriogenology*. 25: 591-600.
213. Payer, B., Saitou, M., Barton, S.C., Thresher, R., Dixon, J.P., Zahn, D., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Nakano, T., Surani, M.A. (2003). Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr. Biol.* 13, 2110–2117.
214. Payne, D., Flaherty, S.P., Barry, M.F. and Matthews, C.D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*. 12: 532–541.
215. Peterson y McMillan 1998
216. Pey, R., Vial, C., Schatten, G. and Hafner, M. (1998). Increase of intracellular Ca²⁺ and relocation of E-cadherin during experimental decompaction of mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(22): 12977–12982.
217. Picard, L., King, W.A., Betteridge, K.J. (1985). Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet Rec*. 117, 603-8.
218. Plachta, N., Bollenbach, T., Pease, S., Fraser, S.E., Pantazis, P. (2011). *OCT4* kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat Cell Biol*. 13, 117–123.
219. Pontes, J.H., Melo Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C., Seneda, M.M. (2011). Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 75(9), 1640-6.
220. Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M. (2009). Comparasion of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriolenology*. 71, 690-697.
221. Pratt, H.P.M., Ziomek, C.A., Reeve, W.J.D. and Johnson M.H. (1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 70: 113–132.

222. Putney, D.J., Drost, M., Thatcher, W.W. (1989). Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*. 31(4), 765-78.
223. Racowsky, C., Combelles, C.M., Nureddin, A., Pan, Y., Finn, A., Miles, L., Gale, S., O'Leary, T., Jackson, K.V. (2003). Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online*. 6(3), 323-331.
224. Radwan; P., Krasiński, R., Radwan, M. and Połać, I. (2014). An ongoing twin pregnancy after embryo time laps monitoring in a patient with a history of IVF failures--case report and literature review. *Ginekol Pol*. 85(4):304-8.
225. Rall W., Fahy, G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313: 573–575.
226. Ramos, S.B., Stumpo, D.J., Kennington, E.A., Phillips, R.S., Bock, C.B., Ribeiro-Neto, F., Blackshear, P.J. (2004). The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp36l2 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development*. 131, 4883–4893.
227. Rappolee, D.A., Basilico, C., Patel, Y., Werb, Z. (1994). Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Development*. 120(8), 2259-69.
228. Riley, P., Anson-Cartwright, L., Cross, J.C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat Genet*. 18, 271-5.
229. Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*. 68(1), 236-43.
230. Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutierrez-Adan, A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod*. 66, 589-595.
231. Roberts, R.M., Chen, Y., Ezashi, T., Walker, A.M. (2008). Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin Cell Dev Biol*. 19, 170-7.
232. Roberts, R.M., Leaman, D.W., Cross, J.C. (1992). Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 200, 7-18.

233. Rodríguez-Alvarez, L., Cox, J., Tovar, H., Einspanier, R., and Castro, F.O. (2010a). Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and *in vitro* produced embryos. *Zygote*. 18, 269-279.
234. Rodríguez-Alvarez, L., Manriquez, J., Velasquez, A., Castro, F.O. (2013). Constitutive expression of the embryonic stem cell marker *OCT4* in bovine somatic donor cells influences blastocysts rate and quality after nucleus transfer. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 49, 657-667.
235. Rodríguez-Alvarez, L., Sharbati, J., Sharbati, S., Cox, J.F., Einspanier, R., and Castro, F.O. (2010b). Differential gene expression in bovine elongated (Day 17) embryos produced by somatic cell nucleus transfer and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 74, 45-59.
236. Rodríguez-Alvarez, L., Cox, J., Navarrete, F., Valdés, C., Zamorano, T., Einspanier, R., Castro, F.O. (2009). Elongation and gene expression in bovine cloned embryos transferred to temporary recipients. *Zygote*. 17(4), 353-365.
237. Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., et al. (1990). POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 345, 686–692.
238. Rossant, J., Guillemot, F., Tanaka, M., Latham, K., Gertenstein, M., Nagy, A. (1998). *Mash2* is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation. *Mech Dev*. 73, 183-91.
239. Rossant, J., Tam, P.P.L. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*. 136, 701–713.
240. Russell, D.F., Baqir, S., Bordignon, J., Betts, D.H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1255-1270.
241. Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonens, D., Bianchi, P.G., Campana, A. (1998). Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod*. 13(1), 182-7.
242. Sakurai, T., Sakamoto, A., Muroi, Y., Bai, H., Nagaoka, K., Tamura, K., Takahashi, T., Hashizume, K., Sakatani, M., Takahashi, M., Godkin, J.D., Imakawa, K. 2009. Induction of

endogenous interferon tau gene transcription by *CDX2* and high acetylation in bovine nontrophoblast cells. *Biol Reprod.* 80(6), 1223-1231.

243. Santos, J.E., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L., Galvão, K.N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci.* 82-83, 513-35.

244. Sasatomi, T., Suefuji, Y., Matsunaga, K., Yamana, H., Miyagi, Y., Araki, Y., Ogata, Y., Itoh, K., Shirouzu, K. (2002). Expression of tumor rejection antigens in colorectal carcinomas. *Cancer.* 94(6), 1636-1641.

245. Satterfield, M.C., Dunlap, K.A., Hayashi, K., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., and Bazer, F.W. (2007). Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by pregnancy and progesterone. *Endocrinology.* 148, 3922-3931.

246. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270, 467–470.

247. Schmoll, F., Schneider, H., Montag, M., Wimmers, K., Rink, K. and Schellander, K. (2003). Effects of different laser-drilled openings in the zona pellucida on hatching of *in vitro*-produced cattle blastocysts. *Fertility and Sterility.* 80(supplement 2):714–719.

248. Scholler, H.R., Balling, R., Hatzopoulos, A.K., Suzuki, N., Gruss, P. (1989). Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* 8, 2551-2557.

249. Schramm, R.D., Paprocki, A.M. (2004). Strategies for the production of genetically identical monkeys by embryo splitting. *Reprod Biol Endocrinol.* 2, 38.

250. Schultz, R.M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays.* 15, 531-538.

251. Sefton, M., Johnson, M.H., Clayton, L. and McConnell, J.M.L. (1996). Experimental manipulations of compaction and their effects on the phosphorylation of uvomorulin. *Molecular Reproduction and Development.* 44(1):77–87.

252. Seike, N., Teranishi, M., Yamada, S., Takakura, R., Nagao, Y., Kanagawa, H. (1989). Increase in calf production by the transfer of bisected bovine embryos. *Nihon Juigaku Zasshi.* 51, 1193-9.

253. Shetty, S., Takahashi, T., Matsui, H., Ayengar, R., and Raghov, R. (1999). Transcriptional autorepression of Msx1 gene is mediated by interactions of Msx1 protein with a multi-protein transcriptional complex containing TATA-binding protein, Sp1 and cAMP-response-element-binding protein-binding protein (CBP/p300). *Biochem. J.* 339, 751-758.
254. Sirard, M.A., Lambert, R.D., Ménard, D.P., Bedoya, M. (1985). Pregnancies after in-vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J Reprod Fertil.* 75(2), 551-6.
255. Skrzyszowska, M., Smorag, Z., and Katska, L. (1997). Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology.* 48, 551-557.
256. Solter, D. (2000). Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat. Rev. Genet.* 1, 199-207.
257. Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev.* 19(1), 65-78.
258. Stojkovic, M., Büttner, M., Zakhartchenko, V., Riedl, J., Reichenbach, H.D., Wenigerkind, H., et al. (1999). Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of *in vivo* derived, *in vitro* produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Anim Reprod Sci.* 55, 151-62.
259. Stojkovic, M., Wolf, E., Buttner, M., Berg, U., Charpigny, G., Schmitt, A., Brem, G. (1995). Secretion of biologically active interferon tau by *in vitro*-derived bovine trophoblastic tissue. *Biol Reprod* 53, 1500–1507.
260. Strickland, S., Reich, E., and Sherman, M.I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell.* 9(2), 231-240.
261. Stroband, H.W., Van der Lende, T. (1990). Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 40, 261–277.
262. Strumpf, D., Mao, C.A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., Rossant, J. (2005). *CDX2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development.* 132, 2093-2102.

263. Su, R.W., Jia, B., Ni, H., Lei, W., Yue, S.L., Feng, X.H., Deng, W.B., Liu, J.L., Zhao, Z.A., Wang, T.S., and Yang, Z.M. (2012). Junctional adhesion molecule 2 mediates the interaction between hatched blastocyst and luminal epithelium: induction by progesterone and LIF. *PLoS One*. 7, e34325.
264. Suzuki, T., Shimohira, I. (1986). Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose: A preliminary report. *Theriogenology*. 26(3), 333-9.
265. Széll, A., Hudson, R.H. (1991). Factors affecting the survival of bisected sheep embryos *in vivo*. *Theriogenology*. 36(3), 379-87.
266. Tadros, W., Lipshitz, H.D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*. 136, 3033–3042.
267. Takeda, T., Hallowell, S.V., McCauley, A.D., and Hasler, J.F. (1986). Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. *Theriogenology*. 25, 204.
268. Tang, H.H., Tsai, Y.C., and Kuo, C.T. (2012). Embryo splitting can increase the quantity but not the quality of blastocysts. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 51, 236-239.
269. Teo, A.K., Arnold, S.J., Trotter, M.W., Brown, S., Ang, L.T., Chng, Z., Robertson, E.J., Dunn, N.R., Vallier, L. (2011). Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through *EOMES*Sodermin. *Genes Dev.* 25(3), 238-50.
270. Tesfaye, D., Lonergan, P., Hoelker, M., Rings, F., Nganvongpanit, K., Havlicek, V., Besenfelder, U., Jennen, D., Tholen, E., and Schellander, K. (2007). Suppression of connexin 43 and E-cadherin transcripts in *in vitro* derived bovine embryos following culture *in vitro* or *in vivo* in the homologous bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 978-988.
271. Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Gross, T.S., Helmer, S.D., Plante, C., Bazer, F.W. (1989). Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil Suppl.* 37, 91-9.
272. Tian, X.C., Kubota, C., Sakashita, K., Izaike, Y., Okano, R., Tabara, N., Curchoe, C., Jacob, L., Zhang, Y., Smith, S., Bormann, C., Xu, J., Sato, M., Andrew, S. and Yang, X. (2005). Meat and milk compositions of bovine clones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 6261–6266.

273. Tong, Z.B., Gold, L., Pfeifer, K.E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C.A., Dean, J., Nelson, L.M. (2000). Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat. Genet.* 26, 267–268.
274. Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Sugie, T., Katsumata, M. (1985). Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology.* 24(3), 337-43.
275. Ushijima, H., Akiyama, K., and Tajima, T. (2008). Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: *in vivo* collected and *in vitro* produced embryos. *J. Reprod. Dev.* 54(4), 239-243.
276. Ushizawa, K., Herath, C.B., Kaneyama, K., Shiojima, S., Hirasawa, A., Takahashi, T., Imai, K., Ochiai, K., Tokunaga, T., Tsunoda, Y., Tsujimoto, G., Hashizume, K. (2004). cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 77.
277. Vajta, G., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. (1997). Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology.* 47, 501-509.
278. Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T. and Callesen, H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, 51: 53–58.
279. van Leeuwen, J., Berg, D.K., Pfeffer, P.L. (2015). Morphological and gene expression changes in cattle embryos from hatched blastocyst to early gastrulation stages after transfer of *in vitro* produced embryos. *PLoS One.* 15;10(6), e0129787.
280. Vejlsted, M., Du, Y., Vajta, G., Maddox-Hyttel, P. (2006). Post-hatching development of the porcine and bovine embryo - Defining criteria for expected development *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology.* 65, 153-165.
281. Velasquez, A.E., Castro, F.O., Veraguas, D., Cox, J.F., Lara, E., Briones, M., and Rodriguez-Alvarez, L. (2016). Splitting of IVP bovine blastocyst affects morphology and gene expression of resulting demi-embryos during *in vitro* culture and *in vivo* elongation. *Zygote.* 24, 18-30.

282. Vernet, M., Bonnerot, C., Briand, P., Nicolas, J.F. (1992). Changes in permissiveness for the expression of microinjected DNA during the first cleavages of mouse embryos. *Mech. Dev.* 36, 129-139.
283. Viebahn, C. (1999). The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Curr Top Dev Biol.* 46, 63-103.
284. Voelkel, S.A., Viker, S.D., Johnson, C.A., Hill, K.G., Humes, P.E., Godke, R.A. (1985). Multiple embryo-transplant offspring produced from quartering a bovine embryo at the morula stage. *Vet Rec.* 117, 528-30.
285. von Eijk, M.J., van Rooijen, M.A., Modina, S., Scesi, L., Folkers, G., van Tol, H.T., Bevers, M.M., Fisher, S.R., Lewin, H.A., Rakacolli, D., Galli, C., de Vaureix, C., Trounson, A.O., Mummery, C.L., Gandolfi, F. (1999). Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod.* 60(5), 1093-1103.
286. Wade, P.A., Pruss, D., Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation. *chromatin in action.* *Trends Biochem. Sci.* 22, 128-132.
287. Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 394, 369-374.
288. Wales, R.G., Cuneo, C.L. (1989). Morphology and chemical analysis of the sheep conceptus from the 13th to the 19th day of pregnancy. *Reprod Fertil Dev.* 1(1), 31-39.
289. Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 127–138.
290. Warde-Farley D., Donaldson, S.L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C., Kazi, F., Lopes, C.T., Maitland, A., Mostafavi, S., Montojo, J., Shao, Q., Wright, G., Bader, G.D., Morris, Q. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 38(Web Server issue):W214-20.
291. Wassarman P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., Williams, Z. (1999). Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool.* 15;285(3), 251-8.

292. Way, A.L., Barbato, G.F., and Killian, G.J. (2001). Identification of norepinephrine in bovine oviductal fluid by high performance liquid chromatography. *Life Sci.* 70, 567-576.
293. Whittingham, D. (1977). Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -96°C . *J Reprod Fertil.* 49: 89–94.
294. Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 320(6057),63-5.
295. Willadsen, S.M., and Polge, C. (1981). Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec.* 108, 211-213.
296. Willadsen, S.M., Polge, C. (1981). Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec.* 108(10), 211-213.
297. Williams, T.J., Elsdon, R.P., and Seidel, J.G. (1984). Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology.* 22, 521-531.
298. Wilmut, I., Schnieke, A.E., Whir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells *Nature*, 385, pp. 810–813.
299. 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.* 1723-35.
300. Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K., Niemann, H. (2004). Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci.* 82-83, 593-603.
301. Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., and Niemann, H. (2001). Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 65, 309-317.
302. Wu, X., Viveiros, M.M., Eppig, J.J., Bai, Y., Fitzpatrick, S.L., Matzuk, M.M. (2003). Zygote arrest 1 (*Zar1*) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat. Genet.* 33, 187–191.
303. Xu, K.P., Greve, T., Callesen, H., and Hyttel, P. (1987). Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 81(2), 501-504.

304. Yamaguchi, S., Hirano, K., Nagata, S., Tada, T. (2011). *SOX2* expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. *Stem Cell Res.* 6(2), 177-186.
305. Yeom, Y.I., Ha, H.S., Balling, R., Scholer, H.R., Artzt, K. (1991). Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev.* 35, 171-179.
306. Young, L.E., Fernandes, K., McEvoy, T.G., Butterwith, S.C., Gutierrez, C.G., Carolan, C., Broadbent, P.J., Robinson, J.J., Wilmut, I., Sinclair, K.D. (2001). Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet.* 27(2), 153-4.
307. Yu, J., Hecht, N.B., Schultz, R.M. (2001). Expression of *MSY2* in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 65, 1260-1270.
308. Zakharova, E.E., Zaletova, V.V. and Krivokharchenko, A.S. (2014). Biopsy of human morula-stage embryos: outcome of 215 IVF/ICSI cycles with PGS. *PLoS ONE.* 9(9).
309. Zeng, F., Baldwin, D.A., Schultz, R.M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev. Biol.* 272, 483–496.
310. Zhan, S., Kubota, C., Yang, L., Zhang, Y., Page, R., O'Neill, M. (2004). Genomic Imprinting of *H19* in Naturally Reproduced and Cloned Cattle. *Biol. Reprod.* 71, 1540-1544.
311. Zhao, X.M., Cui, L.S., Hao, H.S., Wang, H.Y., Zhao, S.J., Du, W.H., Wang, D., Liu, Y., Zhu, H.B. (2016). Transcriptome analyses of inner cell mass and trophectoderm cells isolated by magnetic-activated cell sorting from bovine blastocysts using single cell RNA-seq. *Reprod Domest Anim.* 51(5), 726-735.
312. Zheng, P., Dean, J. (2009). Role of *Filia*, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 7473–7478.
313. Zoheir, K.M., Allam, A.A. (2010). A rapid method for sexing the bovine embryo. *Anim Reprod Sci.* 119, 92-96.

7. ANEXOS

Anexo 1

Medio de manipulación *in vitro* de embriones

TCM 199 - Hepes	Componentes		1000 mL (Agua Milli-Q)
	TCM 199 comercial		1 frasco
	Agua Milli-Q		1000 mL
	NaHCO ₃	4mM	168 mg
	Hepes	18mM	2,383 gr

Aditivos para 100 mL medio de manipulación	Componentes	Conc. de trabajo	Stock	Vol. a adicionar
	TCM 199 – Hepes			90 mL
	Gentamicina	50 µg/mL	50 mg/mL	100 µL
	Suero fetal bovino	10%		10 mL

Filtrar y almacenar en tubos de 50mL a 4°C

Anexo 2

Medio de maduración *in vitro* de embriones

TCM 199	Componentes	
	TCM 199 comercial	500 mL

Aditivos para 10 mL de medio de maduración	Componentes	Concentración de trabajo		Stock	Volumen a adicionar
	TCM 199 medio base				9 mL
	L-Glutamina	0,6 mM	0,1 mg/mL	14,6 mg/mL	20 µL
	Piruvato de sodio	0,2 mM	0,25 mg/mL	11 mg/mL	60 µL
	FSH		0,01 U/mL	100 X	10 µL
	LH		0,01 U/mL	100 X	10 µL
	Gentamicina		50 µg/mL	50 mg/mL	10 µL
	17β Estradiol (E4389)		1 µg/mL	1 mg/mL	10 µL
	Suero fetal bovino		10%		1 mL
	EGF		10 ng/mL	1000 X	10 µL

Filtrar y almacenar en tubos de 15mL a 4°C

Anexo 3

Medio Percoll

CaCl ₂	Componentes	5 mL (Agua Milli-Q)
	CaCl ₂ *2H ₂ O	735 mg
	H ₂ O	5 mL
MgCl ₂	Componentes	10 mL (Agua Milli-Q)
	MgCl ₂ *6H ₂ O	203 mg
	H ₂ O	10 mL
10X SP-TL	Componentes	100 mL (Agua Milli-Q)
	NaCl	4,675 gr
	KCl	230 mg
	NaH ₂ PO ₄	400 mg
	Hepes	2,38 gr
	H ₂ O	100 mL
Percoll 90%	Componentes	10 mL (medio base)
	10X SP-TL	4,0 mL
	NaHCO ₃	84 mg
	Lactato de Sodio	90 µL
	Percoll 100%	36 mL
	CaCl ₂	78 µL
	MgCl ₂	158 µL

Anexo 4

Medio de capacitación espermática

Medio Base TALP-SPERM	Componentes	250 mL (Agua Milli-Q)
	NaCl	1443 mg
	KCl	57,75 mg
	NaH ₂ PO ₄	10,5 mg
	CaCl ₂ *2H ₂ O	73,5 mg
	MgCl ₂ *6H ₂ O	55,7 mg
	Ácido Láctico	0,925mL
	Hepes	650,75 mg
	NaHCO ₃	525 mg
	H ₂ O	248,5 mL

* Ajustar pH a 7,2

** Volumen final 250 mL. Alicutas de 50 mL. Almacenar a 4° C para una duración de 2 meses.

TALP-SP Capacitación	Componentes	50 mL (medio base)
	Medio Base	47,0 mL
	Piruvato 2mM	0,5 mL
	Gentamicina 50µg/mL	0,05 mL
	BSA fracción V	300mg

Anexo 5

Medio de fertilización *in vitro*

Medio Base TALP-FIV	Componentes	250 mL (Agua MilliQ)
	NaCl	1662,5 mg
	KCl	59 mg
	NaH ₂ PO ₄	10 mg
	CaCl ₂ *2H ₂ O	73 mg
	MgCl ₂ *6H ₂ O	25 mg
	Lactato de sodio	0,475 mL
	Hepes	650,75 mg
	NaHCO ₃	525 mg
	Rojo fenol	2,5 mg

* Ajustar pH a 7,2

* Volumen final 250 mL. Alicutas de 50 mL. Almacenar a 4° C con una duración de 2 meses.

TALP-FIV	Componentes	10 mL (medio base)
	Medio Base	10,0 mL
	Piruvato 2mM	100 µL
	Gentamicina 50µg/mL	10 µL
	Heparina 0,01mg/mL	100 µL
	BSA (FAF) 6mg/mL	60 g

Anexo 6

Medio de cultivo *in vitro* SOF (fluido oviductal sintético)

Medio Base	Componentes	250 mL (Agua Mili-Q)
	NaCl	1572,75 mg
	KCl	133,5 mg
	KH ₂ PO ₄	40,5 mg
	CaCl ₂ *2H ₂ O	62 mg
	MgCl ₂ *6H ₂ O	24 mg
	NaHCO ₃	526,5 mg
	Rojo fenol	0,35 mg
	Lactato de sodio	117,65 µL (60 %)

Aditivos para 250 mL de medio base	Componentes	Concentración de trabajo	Stock	Volumen a adicionar
	Piruvato de sodio	0,044 g/L	11 mg/L	1000 µL
	L-Glutamina	0,039 g/L	14,6 mg/L	500 µL
	BSA- FAF	3,0 mg/mL	0,30%	0,75 gr
	Aa esenciales	1X	50 X	5000 µL
	Aa no esenciales	1X	100 X	2500 µL
	EGF	10 ng/mL	1000 X	250 µL
	Ac. Cítrico	0,1 mg/mL	10 mg/mL	250 µL
	Myo-Inositol	0,5 mg/mL	50 mg/mL	2500 µL
	Gentamicina	50 µg/mL	50 mg/mL	250 µL
	Suero fetal bovino.	2%	1 X	5000 µL

Filtrar y almacenar en tubos de 15mL a -80°C.