



Universidad Nacional de General San Martín  
Escuela de Bio y Nanotecnologías  
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde”

**Estudio del epigenoma y transcriptoma de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por fecundación *in vitro* y transferencia nuclear de células somáticas**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Biotecnología y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde”

**LIC. MICAELA NAVARRO**

Director de Tesis: Dr. Adrián A. Mutto.

Co-Directores de Tesis: Dra. Carolina Blüguermann y Dr. Pablo J. Ross.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnologías aplicadas a la Reproducción Animal. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde” perteneciente a la Escuela de Bio y Nanotecnologías.

Buenos Aires, General San Martín, 2022.

## Índice

Abreviaturas .....	6
Resumen general .....	15
General Abstract.....	15
1. Introducción.....	18
1.1: Desarrollo embrionario en mamíferos .....	19
1.2: Factores moleculares involucrados en la especificación celular durante el desarrollo.....	22
1.3: Epigenética del desarrollo .....	26
1.4: Biotecnologías reproductivas .....	31
1.5: Células madre pluripotentes.....	37
1.6: Células madre pluripotentes bovinas y su relación con la vía de señalización de Wnt .....	41
1.7: Epigenética y reprogramación .....	45
1.8: Células madre embrionarias bovinas como modelo de estudio: limitaciones y potenciales aplicaciones .....	48
2. Hipótesis y Objetivos .....	53
2.1 Hipótesis.....	54
2.2 Objetivo general. ....	54
2.3 Objetivos particulares.....	54
3. Capítulo 1: Optimización del método de derivación y cultivo de las células madre embrionarias bovinas.....	56
3: Capítulo 1: Resultados. ....	57
3.1: Viabilidad de los fibroblastos embrionarios murinos irradiados. ....	57
3.2: Sustitución del medio CTFR por los medios E6, N2B27 y mTeSR Plus. Efecto de la suplementación con KSR o BSA .....	58
3.3: Derivación y cultivo de células madre embrionarias bovinas en condiciones NBFR y TPFRR .....	63

3.4: Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas establecidas en condiciones NBFR y TPFR. Marcadores de pluripotencia y estabilidad genómica.....	70
3.5: Potencialidad de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas en condiciones NBFR. Diferenciación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ...	75
3.6: Cultivo de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas en condiciones CTFR y NBFR en ausencia de iMEF .....	78
3.7: Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas en condiciones NBFR y cultivadas sobre Vitronectina. Evaluación de la proliferación, expresión de marcadores de pluripotencia, potencialidad y estabilidad genómica .....	81
3.8: Derivación y cultivo de células madre embrionarias bovinas utilizando el medio NBFR en ausencia total o parcial de los iMEF ..	84
3.9: Estudio de las vías de señalización involucradas en la auto-renovación y pluripotencia de las células madre embrionarias bovinas .....	86
4. Capítulo 2: Estudio del epigenoma y transcriptoma de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos mediante distintas técnicas de biotecnologías reproductivas .....	91
4: Capítulo 2: Resultados. ....	92
4.1: Derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas a partir de embriones producidos por transferencia nuclear de células somáticas y activación partenogenética.....	92
4.2: Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas a partir de distintas fuentes embrionarias. Marcadores de pluripotencia y estabilidad genómica.....	95
4.3: Perfil de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 .....	97
4.4: Estudio del transcriptoma de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS.....	104
4.5: Asociación entre el transcriptoma y el epigenoma de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS.....	109

4.6: Categorización de la cromatina según la combinación de las distintas marcas de histonas en las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS .....	113
5. Discusión y conclusiones generales .....	123
5: Discusión y conclusiones generales .....	124
6. Materiales y métodos.....	145
6.1: Obtención de fibroblastos fetales bovinos .....	146
6.2: Obtención de fibroblastos embrionarios murinos .....	146
6.3: Criopreservación y sub-cultivo de las células somáticas .....	147
6.4: Irradiación y viabilidad de los fibroblastos embrionarios murinos.....	148
6.5: Preparación de los iMEF como capa nutricia .....	149
6.6: Producción de embriones mediante fecundación <i>in vitro</i> .....	149
6.7: Producción de embriones diploides y haploides mediante activación partenogénica .....	151
6.8: Producción de embriones por transferencia nuclear de células somáticas .....	151
6.9: Aislamiento del macizo celular interno mediante inmuno-cirugía .....	153
6.10: Sustitución del medio CTFR por los medios E6, N2B27 y mTeSR Plus .....	153
6.11: Derivación y cultivo de las líneas NBFR-CMEB y TPFR-CMEB ...	154
6.12: Cultivo de las células madre embrionarias bovinas en ausencia de iMEF .....	155
6.13: Derivación y cultivo de las células madre embrionarias bovinas sobre Vitronectina.....	155
6.14: Criopreservación de las líneas de células madre embrionarias bovinas .....	156
6.15: Ensayo de fosfatasa alcalina .....	156
6.16: Inmunofluorescencia .....	157
6.17: Citometría de flujo. ....	157
6.18: Cariotipo.....	158
6.19: Formación de cuerpos embrionarios. ....	159

6.20: Formación de teratomas.....	159
6.21: Efecto de la suplementación o remoción de factores de crecimientos o inhibidores.....	160
6.22: Extracción del ARN total.....	160
6.23: Retrotranscripción del ARN.....	161
6.24: Extracción del ADN genómico.....	161
6.25: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	162
6.26: PCR en tiempo real (qPCR).....	162
6.27: Detección de <i>Mycoplasma sp</i> .....	163
6.28: Preparación de las líneas celulares para <i>3'-Tag-RNA-Seq</i> y <i>CUT&amp;Tag</i> .....	164
6.29: Remoción de los iMEF.....	164
6.30: <i>3'-Tag-RNA-Seq</i> .....	165
6.31: <i>Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&amp;Tag)</i> .....	167
6.32: Análisis estadístico.....	173
6.33: Anticuerpos utilizados durante los ensayos de inmunofluorescencia.....	173
6.34: Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de PCR y qPCR.....	174
6.35: Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de <i>CUT&amp;Tag</i> .....	174
7. Referencias.....	176

## Abreviaturas

5-hmC= 5-Hidroxi-Metil-Citocina

5-mC= 5-Metil-Citosina

6-DMAP= 6-Di-Metil-Amino-Purina

ADN= Ácido Desoxirribonucleico

ADNc= Ácido Desoxirribonucleico copia

ADNg= Ácido desoxirribonucleico genómico

AKT= Proteína quinasa B

APC= Del inglés “*Adenomatous Polyposis Coli gene*”

ARN= Ácido Ribonucleico

ARNm= Ácido Ribonucleico mensajero

BSA= Sero-Albúmina Bovina

c-MYC= Proto-Oncogen c-MYC

CDX2= Del inglés “*Caudal type homeobox 2*”

CENP-A= Proteína Centromérica A

CGP= Células germinales primordiales

ChEA= Del inglés “*ChIP Enrichment Analysis*”

ChIP-Seq= Del inglés “*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*”

CK1 $\alpha$ = Cisteína quinasa 1 $\alpha$

CMEB= Células Madre Embrionarias Bovinas

CMP= Células Madre Pluripotentes

CMPI= Células Madre Pluripotentes Inducidas

COCs= Complejo Oocito- Células del Cúmulus

CPI= Cuerpo Polar 1

CPM= Cuentas por Millón

CUT&Run= Del inglés “*Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease*”

CUT&Tag= Del inglés “*Cleavage under Targets and Tagmentation*”

DDX3X/DDX3Y= Del inglés “*DEAD box helicasa 3*”

DMEM/DMEM-F12= Del inglés “*Dulbecco's Modified Eagle Medium/ F12*”

DMSO= Dimetilsulfóxido

DNMT1/3A/DNMT3B= ADN Metil-Transferasa 1/3A/3B  
DPBS= Del inglés “*Dulbecco Phosphate Buffered Saline*”  
DPBST= DPBS + Tween 20  
DSH/DVL= Del inglés “*Dishevelled-related protein*”  
E-BOX= Del inglés “*Enhancer Box*”  
E6= Del inglés “*Essential 6 media*”  
EHMT1/2= Eucromatina Histona-Lisina MetilTransferasa 1/2  
ELF5= Del inglés “*E74 Like ETS Transcription Factor 5*”  
ENCODE= Del inglés “*Encyclopedia of DNA Elements*”  
EOMES= Del inglés “*Eomesodermin*”  
EpiLSC= Del inglés “*Epiblast Like Stem Cells*”  
EpiSC= Del inglés “*Epiblast-derived Stem Cells*”  
EPSC= Del inglés “*Expanded Potential Stem Cells*”  
ERK= Del inglés “*Extracellular signal-Regulated Kinasa*”  
ESRRB= Del inglés “*Estrogen Related Receptor Beta*”  
FDR= Del inglés “*False Discovery Rate*”  
FGF2/4= Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2/4  
FIV-CMEB= Células Madre Embrionarias Bovinas derivadas de embriones producidos por fecundación *in vitro*  
FIV= Fecundación *in vitro*  
FOXA2= Del inglés “*Forkhead Box A2*”  
FPM= Factor Promotor de la Maduración  
FZ= Receptor *Frizzled*  
GABA= Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GATA3/4/6= Del inglés “*GATA-binding factor 3/4/6*”  
Genes ZNC= Genes de dedos de Zinc  
GSK3B= Glucógeno Sintasa quinasa 3B  
H199-SFB= Medio TCM-199 con sales de Hanks suplementado con 10 % de suero fetal bovino  
H199-SFB-CB= Medio TCM-199 con sales de Hanks suplementado con 10 % de suero fetal y 5  $\mu\text{g/mL}$  de Citocalasina B  
H2A/B/2A.Z= Histona 2 variante A/B/A.Z

H3.3= Histona 3 variante 3

H3= Histona 3

H3K4ac= Acetilación de la lisina 4 en la histona 3

H3K4me3= Triple metilación de la lisina 4 en la histona 3

H3K9me3= Triple metilación de la lisina 9 en la histona 3

H3K27me3= Triple metilación de la lisina 27 en la histona 3

HAT= Histonas Acetiltransferasas

HDAC= Histonas Deacetilasas

HMBS= Del inglés "*Hydroxymethylbilane Synthase*"

IgG= Inmunoglobulina G

iMEF= Fibroblastos Fetales Murinos Irradiados

INT- $\tau$ = Interferón Tau

IWR1/2= Inhibidor de la respuesta de WNT 1/2

JAK/STAT3= Vía de señalización del inglés "*Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling*"

KDM= Histona-Lisina Demetilasa

KLF2/4= Del inglés "*Kruppel Like Factor 2/4*"

KSR= Del inglés "*Knock out Serum Replacement*"

LEF/TCF= Del inglés "*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*"

LIF= Del inglés "*Leukemia inhibitory factor*"

LRP5/6= Del inglés "*LDL Receptor Related Protein 5/6*"

LTR= Del inglés "*Long Terminal Repeat*"

MAPK= Del inglés "*Mitogen-Activated Protein Kinases*"

MCI= Macizo Celular Interno

MEK= Del inglés "*Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*"

MEM-NEAA= Del inglés "*Minimum Essential Medium Non Essential Amino Acids*"

N-terminales= Amino terminales

NANOG= Del inglés "*Nanog Homeobox*"

NANOS3= Del inglés "*Nanos C2HC-Type Zinc Finger 3*"

NBFR= Medio N2B27 + BSA + FGF2 + IWR1

OCT4= Del inglés "*Octamer-binding transcription factor 4*"



OPU= Del inglés “*Ovum Pick-Up*”  
OR= Del inglés “*Odds Ratio*”  
OSKM= Factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC  
P0/3/13= Pasaje cero/tres/trece  
P38= Proteína quinasa p38 activada por mitógenos  
P53= Del inglés “*Cellular tumor antigen p53*”  
PAR-CMEB= Células Madre Embrionarias Bovinas derivadas de embriones producidos por activación partenogénica  
PARilación= poli-ADP-ribosilación  
PAX6= Del inglés “*Paired Box 6*”  
PCR= Reacción en cadena de la polimerasa  
PGE2= Prostaglandina E2  
PGF2 $\alpha$ = Prostaglandina F2 $\alpha$   
PP2A= Proteína Fosfatasa 2A  
PRC2= Complejo Represivo Polycomb-2  
qPCR= Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa (o en tiempo real)  
REX1= También conocido como ZFP42, del inglés “*Zinc finger Protein 42*”  
Rocki= Inhibidor de la quinasa Rho  
RPKM= Del inglés “*Reads Per Kilobase Million*”  
RQI= Del inglés “*RNA Quality Index*”  
rsPSC= Del inglés “*Region Selective Pluripotent Stem Cells*”  
SALL4= Del inglés “*Spalt Like Transcription Factor 4*”  
SD= Solución de Digitonina  
SETDB1= Histona-Lisina dominio SET bifurcada Metiltransferasa 1  
SFB= Suero Fetal Bovino  
SL= Solución de Lavado  
SLD= Solución de Lavado y Digitonina  
SMAD2/3= Del inglés “*SMAD Family Member 2/3*”  
SNB= Suero Normal de Burro  
SOX17= Del inglés “*SRY-Box Transcription Factor 17*”  
SOX2= Del inglés “*Sex determining Region Y-box 2*”

SSEA1= Del inglés “*Stage Specific Embryonic Antigen 1*”

SSEA4= Del inglés “*Stage Specific Embryonic Antigen 4*”

ST= Solución de Tagmentación

SUV39H1/2= Histona-Lisina N- Metiltransferasa 1/2, del inglés “*Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1/2*”

TBX3= Del inglés “*T-Box Transcription Factor 3*”

TDPBS= Tritón X-100 + DPBS

TE= Trofectodermo

TEAD4= Del inglés “*TEA Domain Transcription Factor 4*”

TES= Sitio de finalización de la transcripción, del inglés “*Transcription Exit Site*”

TET= Del inglés “*Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase*”

TFCP2L1= Del inglés “*Transcription Factor CP2 Like 1*”

TGFβ= Factor de Crecimiento Transformante β

TN= Transferencia Nuclear

Tn5= Transposasa 5

TNCS-CMEB= Células Madre Embrionarias Bovinas derivadas de embriones producidos por transferencia nuclear de células somáticas

TNCS= Transferencia Nuclear de Células Somáticas

TPFR= Medio mTeSR Plus + FGF2 + IWR1

TRA-1-60= Del inglés “*Tumor Rejection Antigen 1-60*”

TRA-1-81= Del inglés “*Tumor Rejection Antigen 1-81*”

TRIM5= Del inglés “*Tripartite Motif Containing 5*”

TSS= Sitio de comienzo de la transcripción, del inglés “*Transcription Starting Site*”

UMIs= Identificadores Moleculares Únicos

UTR= Del inglés “*UnTranslated Region*”

Wnt3a= Del inglés “*Wnt Family Member 3A*”

Xist= Del inglés “*X Inactive Specific Transcript*”

YAP1= Del inglés “*Yes1 Associated Transcriptional Regulator*”

ZFP206= Del inglés “*Zinc Finger Protein 206*”

## Resumen general

En el año 1962, John Gurdon produjo embriones de renacuajo mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) luego de transferir el núcleo de células epiteliales de rana al citoplasma de un oocito enucleado. Años más tarde, con el nacimiento del primer mamífero clonado reportado (la oveja Dolly, 1997), se refutó el dogma establecido en el cual se consideraba que la diferenciación celular era un proceso irreversible. El nacimiento de la oveja Dolly creó un nuevo paradigma en el área de la biología celular y reproductiva, demostrando por primera vez que una célula comprometida a un linaje celular era capaz de retornar a un estado embrionario luego de ser expuesta a los factores de reprogramación presentes en un oocito. En los últimos 24 años, más de 20 especies de mamíferos han sido clonadas, incluyendo primates y humanos. Sin embargo, aún no se han logrado grandes desarrollos para aumentar significativamente la eficiencia de la técnica ya que no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares capaces de orquestar la reprogramación celular.

La eficiencia de la TNCS ronda entre el 0-10% de crías nacidas vivas por embrión transferido. Las pérdidas durante la clonación pueden ocurrir en estadios pre- y post-implantatorios, donde los procesos más críticos son la activación del genoma embrionario, la implantación y el nacimiento. Es frecuente observar clones nacidos con anomalías que incluyen trastornos metabólicos, defectos cardíacos y respiratorios, entre otros. Muchos trabajos han evidenciado que gran parte de estos problemas se deben a desórdenes epigenéticos, y consecuentemente, transcriptómicos que son producto de la incorrecta reprogramación de la célula donante, haciendo que ésta retenga parte de su memoria epigenética. Esta memoria epigenética suele estar vinculada con desregulaciones en la metilación del ADN, ARN no codificantes y de marcas de histonas. Dentro de las marcas de histonas, la triple metilación de la lisina 4 en la histona 3, la triple metilación de la lisina 9 en la histona 3, y la triple metilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3, respectivamente) han sido identificadas como barreras epigenéticas durante el desarrollo embrionario en clones.

En bovinos numerosos reportes han relacionado los defectos observados en embriones producidos por TNCS con una alteración en el fenotipo de las células del trofotodermo (células que darán origen a los derivados extraembrionarios como la placenta); aunque poco se conoce acerca de las características moleculares y el estado epigenético de las células que conforman el macizo celular interno (MCI) las cuales darán origen al individuo propiamente dicho. Sin embargo, dado que el

MCI está compuesto por una cantidad acotada de células (por lo que se necesitaría una gran cantidad de embriones para poder evaluar *in vitro* el estado epigenético y transcriptómico del mismo) y que su aislamiento involucra procesos poco eficientes y costosos, es que resulta necesario encontrar un modelo de estudio alternativo para poder estudiarlo.

Las células madre embrionarias derivan a partir del MCI de un blastocisto y pueden ser cultivadas *in vitro* de manera indefinida, lo que permite no solo recrear indefinidamente un estadio de desarrollo embrionario que naturalmente posee una ventana temporal acotada, sino también contar con un mejor modelo para el estudio *in vitro* del desarrollo embrionario. Además de su alta capacidad proliferativa, estas células son pluripotentes, es decir tienen la capacidad de originar derivados de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre embrionarias fueron obtenidas hace más de 25 años en murinos (1981), primates (1995) y humanos (1998); aunque su obtención a partir de animales de granja sólo fue posible recientemente.

Las células madre embrionarias de la especie bovina (CMEB) fueron derivadas en el año 2018, utilizando condiciones de cultivo similares a las empleadas para el cultivo de células madre humanas de región selectiva. Estas condiciones involucran el uso de fibroblastos embrionarios murinos irradiados (iMEF) como capa nutricia, y un medio de cultivo (denominado CTFR) el cual contiene en su composición el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el inhibidor de la vía de Wnt IWR1. Las CMEB derivadas en estas condiciones demostraron ser estables por períodos de tiempo prolongados y mantuvieron su estado pluripotente. Sin embargo, las condiciones de cultivo utilizadas eran poco reproducibles ya que el medio de cultivo no se encontraba disponible comercialmente y su preparación era extremadamente compleja. Además, el uso de los iMEF también contribuía a disminuir la reproducibilidad del método de cultivo.

En base a esto y con el fin de estudiar si los embriones bovinos producidos por TNCS poseen alteraciones moleculares a nivel del epigenoma y transcriptoma en su MCI, en el presente trabajo derivamos nuevas líneas de CMEB a partir de embriones producidos por TNCS (TNCS-CMEB) para luego comparar su transcriptoma y epigenoma con el de CMEB derivadas a partir de embriones producidos por fecundación *in vitro* (FIV-CMEB). Para ello, previamente debimos simplificar las condiciones de cultivo originales de manera de lograr un modelo de trabajo reproducible y robusto, buscando alternativas simples y accesibles, capaces de derivar y mantener el estado pluripotente de las CMEB.

Como resultado logramos encontrar dos medios de cultivo alternativos al medio de cultivo CTFR: el medio comercial mTeSR Plus y el medio N2B27 suplementado con sero-albúmina bovina (BSA). Ambas alternativas comerciales, suplementadas con FGF2, IWR1 y en presencia de iMEF, pudieron ser utilizadas para derivar y mantener el estado indiferenciado de líneas de CMEB a partir de embriones producidos por FIV. Las líneas de CMEB obtenidas crecieron como colonias compactas, mostraron expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2, y lograron ser cultivadas *in vitro* por un largo período de tiempo (>35 pasajes) manteniendo un cariotipo euploide. Además, exhibieron su potencial pluripotente al formar teratomas luego de ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos. Finalmente, logramos reemplazar a los iMEF por la matriz Vitronectina que, en conjunto con el medio N2B27 suplementado con FGF2, IWR1, BSA y Activina A, lograron mantener las características pluripotentes de las células en cultivo.

Habiendo simplificado las condiciones de cultivo, continuamos por producir embriones mediante TNCS y activación partenogénica para derivar nuevas líneas de CMEB en estas condiciones. Logramos establecer líneas de TNCS-CMEB con igual eficiencia que las FIV-CMEB, mientras que el establecimiento de líneas celulares a partir de embriones producidos por activación partenogénica fue ineficiente. En ambos casos, las líneas establecidas exhibieron características pluripotentes las cuales eran similares a las observadas por las líneas FIV-CMEB. El estudio del transcriptoma reveló que las FIV-CMEB y TNCS-CMEB tenían un transcriptoma muy similar entre sí, y a la vez distinto al de las células somáticas utilizadas como donantes de material genético durante la técnica de TNCS. Se encontraron únicamente 46 genes diferencialmente expresados entre ellas (<2%), los cuales no estaban asociados a una función biológica relevante. De igual forma, el estudio del epigenoma reveló que ambas fuentes de CMEB conservaban una distribución similar de las marcas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3, siendo la marca H3K9me3 la que mostró mayores diferencias, sobretodo en regiones intergénicas enriquecidas por los dominios *Gata3*, *p53* y *E-box*. Las pocas diferencias encontradas entre los distintos tipos de CMEB estaban distribuidas a lo largo de todo el genoma, sin estar asociadas a genes diferencialmente expresados o genes involucrados en el desarrollo. Finalmente, mediante la clasificación de las regiones genómicas según la combinación de las distintas marcas de histonas, logramos confirmar que las CMEB conservaban el mismo perfil epigenético, especialmente en las regiones promotoras.

En base a las marcas epigenéticas analizadas, concluimos que las CMEB derivadas de embriones producidos por TNCS son equivalentes a las CMEB derivadas de embriones producidos por FIV,

lo cual indicaría que el MCI de embriones producidos por TNCS no presenta alteraciones epigenéticas o transcriptómicas, producto de la ineficiente reprogramación del núcleo donante.

La obtención de CMEB de forma simple, eficiente y reproducible a partir de distintas fuentes embrionarias permitirá hacer uso de estas células en programas de selección genética, producción de gametas *in vitro*, ingeniería genética, carne cultivada, modelado de enfermedades, entre otros. Finalmente, estos hallazgos otorgan la posibilidad de producir células madre pluripotentes a partir de organismos de alto mérito genético sin recurrir al uso de técnicas de edición génica.

**Palabras claves:** N2B27, FGF2, IWR1, macizo celular interno, células madre embrionarias bovinas, pluripotencia, transferencia nuclear de células somáticas, fecundación *in vitro*, epigenética, transcriptoma.

## General abstract

In 1962, John Gurdon produced frog embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT) after transferring the nucleus of a frog epithelial cell into the cytoplasm of an enucleated oocyte. Later, with the birth of the first reported cloned mammal (Dolly the sheep, 1997), the established dogma which considered that cell differentiation was an irreversible process, was refuted. The birth of Dolly created a new paradigm in the area of cellular and reproductive biology, demonstrating that a totally differentiated cell could return to an embryonic state after being exposed to the reprogramming factors present in an oocyte. In the last 24 years, SCNT has been successfully achieved in more than 20 different mammals, including primates and humans. However, this technique remains highly inefficient mainly because the molecular mechanisms involved in orchestrating the cell reprogramming process are still unknown.

The efficiency of SCNT ranges between 0-10% of live births per embryo transferred. Embryonic loss during cloning can occur in both pre- and post-implantation stages, where the most critical steps are the embryonic genome activation, the implantation and the birth. Frequently, born clones exhibit abnormalities that include metabolic disorders, cardiac and respiratory defects, among others. Many reports have shown that most of these problems are due to epigenetic aberrations, and consequently, transcriptomic disorders that result from the incorrect reprogramming of the donor cell used as nuclear donor during SCNT, which retains part of its epigenetic memory. This epigenetic memory is often linked to dysregulations in DNA methylation, non-coding RNAs and histone marks. Among the histone marks, the triple methylation of lysine 4 on histone 3, the triple methylation of lysine 9 on histone 3, and the triple methylation of lysine 27 on histone 3 (H3K4me3, H3K9me3, and H3K27me3, respectively) have been identified as epigenetic barriers during embryonic development in SCNT embryos.

In cattle, several reports have related the defects observed in SCNT embryos with an aberrant development of the trophectoderm cells (cells that will give rise to extra-embryonic derivatives such as the placenta); although little is known about the molecular features and the epigenetic status of the cells in the inner cell mass (ICM) of SCNT blastocysts. However, given that the ICM is composed of a limited number of cells (meaning that a large number of embryos would be necessary to evaluate its epigenetic and transcriptomic status *in vitro*) and that its isolation involves

inefficient and costly processes, it is necessary to find a new model to investigate its molecular characteristics in depth.

Embryonic stem cells are derived from the ICM of blastocysts and can be indefinitely cultured *in vitro*, allowing to recreate an embryonic stage that naturally exists in a short period of time and thus, providing an *in vitro* model for studying embryo development. Apart from the high proliferation rate, these cells are also pluripotent, which means that they can originate derivatives of the three embryonic layers (endoderm, mesoderm and ectoderm). While these cells were obtained more than 25 years ago in murine (1981), primate (1995) and human (1998); in livestock animals they have been only recently derived.

Bovine embryonic stem cells (bESCs) were obtained in 2018 under culture conditions similar to those used for obtaining region selective human stem cell. These conditions involve the use of irradiated murine embryonic fibroblasts (iMEF) as a feeder layer, and a culture medium (called CTFR) which contains fibroblast growth factor 2 (FGF2) and the Wnt signaling inhibitor IWR1. bESCs derived under these conditions were stable and maintained their pluripotent state after long-term culture. Nonetheless, CTFR culture medium was inaccessible since it was not commercially available and its preparation was extremely complex. Moreover, the use of iMEFs as feeder layer contributed to reduce the reproducibility of the culture.

Taking this into consideration and in order to study whether bovine embryos produced by SCNT have epigenetic and transcriptomic alterations in their ICM, we derived new bESCs lines from SCNT embryos (SCNT-bESC ) to compare their transcriptome and epigenome with that of bESCs derived from IVF embryos (IVF-bESCs). With that purpose, we first sought to simplify the original culture conditions in order to achieve a more reproducible and simpler method, capable of deriving and maintaining the pluripotent state of the bESCs.

As result, we were able to replace the CTFR culture medium by the commercially available media mTeSR Plus and N2B27 supplemented with bovine serum albumin (BSA). Both commercial alternatives, supplemented with FGF2 and IWR1 in the presence of iMEF, could be used for deriving and maintaining the undifferentiated state of bESCs derived from IVF embryos. Bovine ESCs lines grew as compact colonies, showed expression of the pluripotency markers OCT4 and SOX2, and were long-term cultured (>35 passages) maintaining an euploid karyotype. Furthermore, they exhibited their pluripotent potential by forming teratomas after being injected into immunodeficient mice. Finally, we were able to replace the use of iMEF by Vitronectin which,



together with the N2B27 medium supplemented with the FGF2, IWR1, BSA and Activin A, maintained the pluripotent state of the cells.

After simplifying the culture conditions, we produced SCNT and parthenogenic activated embryos to derive new bESC lines in these conditions. While SCNT-bESCs lines were established with the same efficiency as IVF-bESCs, the establishment of cell lines derived from embryos produced by parthenogenetic activation was inefficient. In both cases, the established cell lines showed pluripotency features similar to those exhibited by IVF-bESCs lines. The study of the transcriptome revealed that IVF-bESCs and SCNT-bESCs had a very close transcriptome that was in turn, different from that of the somatic cells used as nuclear donors during SCNT. We found only 46 differentially expressed genes between both bESCs sources (<2%), which were not associated with a relevant biological function. In addition, the study of the epigenome showed that both bESCs sources had a similar distribution of the histone marks H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3, being the H3K9me3 the most variable, especially in intergenic regions enriched by *Gata3*, *p53* and *E-box* motifs. The few differences found between both bESCs sources were distributed throughout the genome, without showing any association with differentially expressed genes or developmentally important genes. Finally, by classifying the genomic regions according to their chromatin state, we confirmed that both bESCs conserved a very similar epigenetic profile, especially in promoters.

Based on the epigenetic marks analyzed, we conclude that bESCs derived from IVF or SCNT embryos can be considered equivalent, indicating that the ICM of SCNT embryos would not carry epigenomic or transcriptomic alterations as a result of an inefficient reprogramming of the nucleus of the donor cell.

Obtaining bESCs with a simple, efficient and reproducible method from different embryonic sources will allow the use of these cells in genetic selection programs, *in vitro* gamete generation, genetic engineering, cultured meat production, disease modeling, among other applications. Finally, these findings provide the possibility of producing pluripotent stem cells from high genetic merit organisms without resorting to gene editing techniques.

**Key words:** N2B27, FGF2, IWR1, inner cell mass, bovine embryonic stem cells, pluripotency, somatic cell nuclear transfer, *in vitro* fertilization, epigenetic, transcriptomic.

## ○ **Introducción**

### 1.1: Desarrollo embrionario en mamíferos.

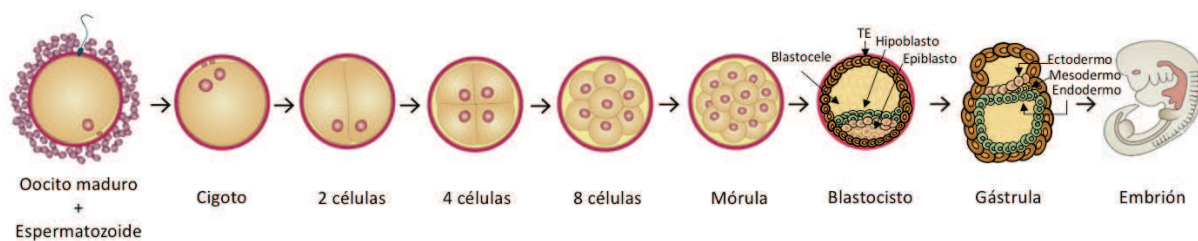
El desarrollo embrionario comienza cuando dos células haploides, el oocito y el espermatozoide, se fusionan en el oviducto para formar una única célula con un núcleo diploide denominada cigoto. En el inicio del desarrollo embrionario, el cigoto comienza a sufrir sucesivas divisiones mitóticas asimétricas sin aumentar su tamaño, proceso llamado segmentación o clivaje, que dará lugar a células hermanas conocidas como blastómeras. Durante los primeros estadios del clivaje, las divisiones y la viabilidad del embrión están dirigidas exclusivamente por factores maternos como ARNm y proteínas provenientes del citoplasma oocitario, debido a que el genoma embrionario aún no es funcional <sup>1</sup>. El momento en el cual se produce la activación del genoma embrionario varía según la especie, por ejemplo en la especie murina la activación ocurre en el estadio de 2 células mientras que en humanos ocurre en el estadio de entre 4-8 células y en bovinos ocurre en el estadio entre 8-16 células <sup>2</sup>. Una vez que se produce la activación del genoma embrionario, los factores maternos son degradados y el embrión comienza a producir sus propios ARNs y proteínas. Al llegar al estadio de mórula (embrión de 32 células en bovinos, 16 células en humanos y 8 células en ratón), las blastómeras cambian su conformación, maximizando el contacto entre células, y luego se polarizan determinando así la futura contribución de cada linaje celular en el desarrollo del embrión. Las células exteriores poseen una región apical con microvellosidades donde la principal interacción célula-célula está dada por uniones de tipo estrecha, mientras que la región basal posee elementos basolaterales en donde la comunicación y unión entre células está dada mediante uniones de tipo *gap*. Estas células polarizadas externas son de gran tamaño y actúan como barrera física entre el embrión y el ambiente materno, y serán las responsables de originar el futuro trofotodermo (TE). Por el contrario, las células internas son pequeñas, apolares las cuales interactúan mediante uniones de tipo *gap* y tendrán como destino originar el MCI del embrión <sup>3</sup>. Luego de la formación de la mórula, esta estructura multicelular se compacta y da lugar al proceso de cavitación que produce un aumento en el tamaño del embrión. Durante este evento, comienza un transporte activo de iones y agua hacia el interior del embrión gracias a la acción de bombas de sodio y potasio ubicadas en la región basal de las células polares, formándose un espacio llamado blastocele. Por otra parte, las células del presunto MCI continúan dividiéndose fijadas en un polo del embrión, aislándose parcialmente del blastocele. De esta forma es como se produce la estructura embrionaria conocida como blastocisto, la cual está conformada por el TE y el MCI <sup>3</sup>.

Estos tipos celulares se diferencian en la expresión de marcadores moleculares, en las proteínas de adhesión y en el destino celular resultante. El TE consiste en un epitelio ubicado en la periferia interna de la zona pelúcida y es responsable de formar tejidos extraembrionarios como la placenta. El MCI consiste en un grupo de dos subpoblaciones celulares agrupadas en uno de los polos del embrión. Por un lado, uno de los subgrupos celulares es segregado a la superficie del MCI quedando en contacto con la cavidad blastocélica, formando el hipoblasto (en rumiantes) o endodermo primitivo (en murinos) el cual dará origen a tejidos endodérmicos extraembrionarios (futuro saco vitelino). Por otro lado, la segunda subpoblación celular conformará el epiblasto a partir del cual se formará la cavidad amniótica y el epiblasto embrionario, el cual originará los derivados de las 3 capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) y el embrión propiamente dicho <sup>4</sup>. El hipoblasto y el epiblasto en conjunto forman una estructura denominada disco germinal bilaminar.

A medida que el desarrollo continúa, el blastocisto aumenta de tamaño hasta que el fluido del blastocelo ejerce presión sobre la zona pelúcida resultando en la eclosión del embrión. En este momento, el blastocisto se encontrará en el útero y se deberá establecer la comunicación materno-embriónica. Esta comunicación está dada por señales celulares, moleculares y endócrinas emitidas por el embrión, el endometrio y el cuerpo lúteo presente en el ovario, que será el responsable de la producción de progesterona y el mantenimiento de la preñez, al menos en la mayoría de los animales domésticos. Para que la implantación y el desarrollo del embrión sean exitosos, debe ocurrir una inhibición de la luteólisis (lisis del cuerpo lúteo) y una modificación del ambiente endometrial, que en la especie bovina está regulada por el interferón tau o interferón trofoblástico bovino (bINT- $\tau$ ) <sup>5</sup>. El bINT- $\tau$  es secretado por las células del trofoblasto y actúa sobre el endometrio materno disminuyendo la secreción de la hormona luteolítica prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  y favoreciendo la secreción de la hormona luteoprotectiva PGE<sub>2</sub>.

Posteriormente, en estadios embrionarios post-implantatorios ocurrirán cambios en la estructura del embrión, evento denominado gastrulación. Este evento está caracterizado principalmente por procesos de diferenciación, invaginación y migración celular que darán como resultado el estadio de gástrula en el cual el disco bilaminar se convierte en un disco trilaminar compuesto por las 3 capas embrionarias. Mediante movimientos coordinados (invaginación, involución, ingresión, delaminación y epibolia), las células adquieren nuevas posiciones y por lo tanto, nuevas células vecinas, estableciéndose el plan corporal <sup>1,5</sup>. Producto de estos movimientos y por la proliferación

y condensación de células del epiblasto en el plano medial del disco embrionario bilaminar, se forma una estructura visible llamada línea primitiva que aparecerá en lo que será la parte posterior del embrión. Las células del epiblasto se desplazan hacia la línea primitiva y se invaginan por ella, ubicándose por debajo del epiblasto y entre las células del hipoblasto/endodermo primitivo. La aparición de la línea primitiva permite establecer polaridad en el embrión mediante la definición del eje cráneo-caudal, superficies dorsal y ventral, y lados derecho e izquierdo, junto con el establecimiento del ectodermo, mesodermo y endodermo, formándose la gástrula. Para el establecimiento de las capas embrionarias, las primeras células que migran son las situadas en la región más anterior de la línea primitiva y se introducen en el hipoblasto, desplazando sus células para formar el endodermo embrionario que dará origen a tejidos como el revestimiento interno del tubo digestivo, las vías respiratorias y algunas glándulas como el hígado, páncreas y próstata, entre otras <sup>5</sup>. Posteriormente, las células del epiblasto que siguen invaginándose por la línea primitiva se ubican entre el epiblasto y el endodermo recientemente formado para dar lugar al mesodermo que originará tejidos musculares y el aparato circulatorio. Finalmente, las células que quedan expuestas en la capa exterior conforman el ectodermo que originará el sistema nervioso, la epidermis, entre otros tejidos <sup>5</sup> (Figura 1). Las células germinales quedan excluidas de este proceso <sup>6</sup>.



**Figura 1:** Esquema del desarrollo embrionario en mamíferos. Se representan las distintas etapas del desarrollo embrionario, abarcando desde estadios embrionarios pre-implantatorios hasta la conformación de un embrión.

Posterior a la gastrulación, ocurren dos procesos de forma simultánea que son la formación de las membranas extraembrionarias (amnios, saco vitelino, alantoides y el corion) que darán origen a la placenta (que en bovinos posee una conformación cotiledónea epiteliocorial), y la organogénesis para la formación de los órganos del feto. El feto continuará con su crecimiento y desarrollo hasta el momento del parto el cual se producirá, en bovinos, luego de aproximadamente 9 meses de gestación <sup>7</sup>.

## 1.2: Factores moleculares involucrados en la especificación celular durante el desarrollo.

El destino de cada célula que conforma al embrión comienza a determinarse en estadios iniciales del desarrollo (desde el cigoto) debido a la acumulación diferencial de factores de transcripción, y de su afinidad de interacción con el ADN<sup>8</sup>. El rol de cada uno de estos factores involucrados varía según la especie. En murinos, una de las especies más estudiadas, el destino celular del TE depende de una cascada de eventos que involucran a factores como *Yap1*, *Tead4*, *Gata3*, *Cdx2*, *Eomes* y *Elf5*; mientras que la formación del MCI está regulado por factores como *Sall4*, *Oct4*, *Sox2* y *Nanog*<sup>9</sup>.

El factor de transcripción *Oct4* (también conocido como *Pou5f1*) pertenece a la familia de factores *Pou* y tiene la capacidad de actuar sobre numerosas regiones génicas modificando la expresión de diversos genes involucrados en el desarrollo de mamíferos, en la especificación del linaje celular y en el mantenimiento de las células germinales. En mamíferos, la expresión de *Oct4* varía a medida que avanza el desarrollo, siendo casi indetectable durante los primeros estadios (ya que los únicos transcritos de *Oct4* que se encuentran presentes son aquellos provenientes del oocito), y produciéndose una transcripción activa del mismo a partir de la activación del genoma embrionario y hasta que ocurre la compactación. Sin embargo, durante la cavitación y la formación de la blástula ocurren las principales diferencias entre las distintas especies. En la especie murina, la expresión de *Oct4* es detectada exclusivamente en células que formarán el MCI<sup>10</sup>. Por el contrario, en bovinos, tanto las células que formarán el MCI como el TE mostrarán expresión de este factor<sup>11,12</sup>. Luego de la implantación, *Oct4* continuará expresándose en el epiblasto, transitoriamente en el hipoblasto/endodermo primitivo, y según la especie, en el TE. Finalmente, durante la gastrulación, la expresión de *Oct4* en el epiblasto disminuirá y se restringirá a las células germinales primordiales (CGP)<sup>13,14</sup> (Figura 2).

En ensayos de pérdida de función realizados en embriones murinos, la ausencia de *Oct4* no afectó la formación del epiblasto y del TE; sin embargo, este factor fue necesario para el correcto desarrollo del endodermo primitivo<sup>15,16</sup>. En el caso de la especie bovina, la eliminación de *Oct4* en estadios tempranos del desarrollo impidió la formación del blastocisto, provocando que se detenga el desarrollo en el estadio de mórula<sup>11</sup>. En células madre embrionarias las cuales se derivan a partir del MCI de un blastocisto, la expresión de *Oct4* demostró ser necesaria para mantener a las células en un estado indiferenciado, y por lo tanto es considerado como un marcador

de pluripotencia<sup>17,18</sup>. En ausencia de este factor, células madre embrionarias humanas y murinas cultivadas *in vitro* se diferencian hacia células del TE<sup>19,20</sup>, mientras que la sobreexpresión del mismo induce la diferenciación hacia el linaje del endodermo primitivo o mesodermo<sup>21</sup>. De esta forma, queda en evidencia que los niveles de *Oct4* determinan el destino celular, y que los mismos deben estar finamente regulados ya que variaciones en su nivel de expresión pueden impactar directamente sobre el mantenimiento del programa transcripcional del estado pluripotente.

Otro de los principales factores que se expresa en el MCI es *Sox2*, el cual pertenece a la familia de proteínas *Sox* (del inglés “*Sry-related HMG box-containing*”) y es conocido como un cofactor de *Oct4* ya que actúan en conjunto modificando la expresión de un gran repertorio de genes (Ej. *Zfp206*, *Fgf4*, etc)<sup>14</sup>. Desde estadios tempranos del desarrollo, *Sox2* está involucrado en la especificación del linaje celular y es un factor esencial para mantener el estado pluripotente del epiblasto<sup>8,22</sup>. Si bien en murinos y bovinos su expresión se ve restringida al MCI del blastocisto, en murinos su expresión comienza a ser detectada en el estadio de mórula mientras que en bovinos se detecta en el estadio de 16 células<sup>23</sup>. En estadios más avanzados, *Sox2* se expresa exclusivamente en el epiblasto y en el ectodermo extraembrionario adyacente. Posteriormente, según la especie, ARNm de *Sox2* pueden ser hallados en el corion, en el futuro neuroectodermo, así como también en células germinales primordiales<sup>24</sup> (Figura 2).

Estudios de pérdida de función en embriones murinos y bovinos han demostrado que la eliminación de *Sox2* afecta la formación del MCI<sup>23</sup>. En células madre embrionarias humanas y murinas, se ha demostrado que *Sox2* participa en la auto-renovación celular, y que la eliminación o sobreexpresión del factor produce la diferenciación de las células hacia células del TE<sup>25,26</sup>.

Más abajo en la jerarquía de los factores responsables del mantenimiento de la pluripotencia se ubica *Nanog*, el cual es un factor de transcripción responsable del mantenimiento de la pluripotencia y posee una expresión espacio-temporal más acotada. Su función radica en evitar que las células del MCI se conviertan en células del hipoblasto o endodermo primitivo, y por lo tanto en evitar que se diferencien a derivados endodermales. En bovinos, la expresión de *Nanog* es detectada a partir del estadio de 8 células, mientras que en murinos la expresión de este factor es observada más tardíamente en las células más internas que componen la mórula compacta. En ambas especies, en el estadio de blastocisto, la expresión de *Nanog* es únicamente detectada en la subpoblación del MCI que conformará el futuro epiblasto<sup>27,28</sup>. Luego de la implantación, su

expresión decae y sus transcriptos pueden ser detectados en un subconjunto de células del epiblasto y en células germinales post-migratorias (Figura 2).

Mediante la generación de embriones murinos y bovinos en los cuales se eliminó al gen *Nanog*, se ha observado que los mismos son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto y formar el TE, aunque poco después de la implantación detienen su desarrollo debido a que falla la especificación del epiblasto el cual se desvía hacia un destino endodérmico<sup>29,30</sup>. En células madre embrionarias murinas y humanas, *Nanog* es responsable de mantener la auto-renovación y pluripotencia celular. Estudios de pérdida de función en células madre embrionarias revelaron que en ausencia del factor, las células se diferencian a células endodermales<sup>31,32</sup>.

Como mencionamos, estos tres factores no solo actúan regulando el programa transcripcional del estado pluripotente, sino que también interactúan entre sí controlando su propia expresión. *Oct4* y *Sox2* pueden controlar la transcripción de *Nanog* y a su vez este último, puede activar la transcripción de *Oct4*. Se ha reportado que embriones bovinos a los que se les ha eliminado el gen *Oct4* también carecen de la expresión de *Nanog*<sup>33</sup>. Asimismo, *Oct4* y *Sox2* pueden ser auto-regulados por el complejo *Oct4/Sox2* lo que sugiere un sistema de retroalimentación positiva. Estos factores suelen actuar de forma sinérgica ya que tienen la capacidad de unirse simultáneamente a los mismos genes blanco, modulando su activación o represión. En células madre embrionarias, la expresión de estos tres marcadores de pluripotencia determina el estado de desarrollo en el cual se encuentran las células: la expresión de *Oct4* y *Sox2* representa estadios pre-implantatorios hasta el momento de la gastrulación, mientras que la expresión de *Nanog* representa estadios pre-implantatorios hasta poco después de la implantación<sup>34</sup>.

Conforme avanza el desarrollo, se especifica el endodermo primitivo/hipoblasto, el cual posee expresión de los factores *Gata*. Los factores de transcripción *Gata* pueden dividirse en dos familias: *Gata1-3* y *Gata4-6*. *Gata1*, *Gata2*, y *Gata3* regulan el desarrollo y diferenciación de linajes hematopoyéticos, mientras que *Gata4*, *Gata5*, y *Gata6* están involucrados en el desarrollo cardíaco y de derivados endodermales. En embriones, estudios de pérdida de función de los factores *Gata* han demostrado que la deficiencia de alguno de estos factores (con excepción de *Gata5*) resulta en la letalidad del embrión durante la gestación, demostrando la importancia de esta familia de genes durante el desarrollo embrionario y/o placentario<sup>35-39</sup>.

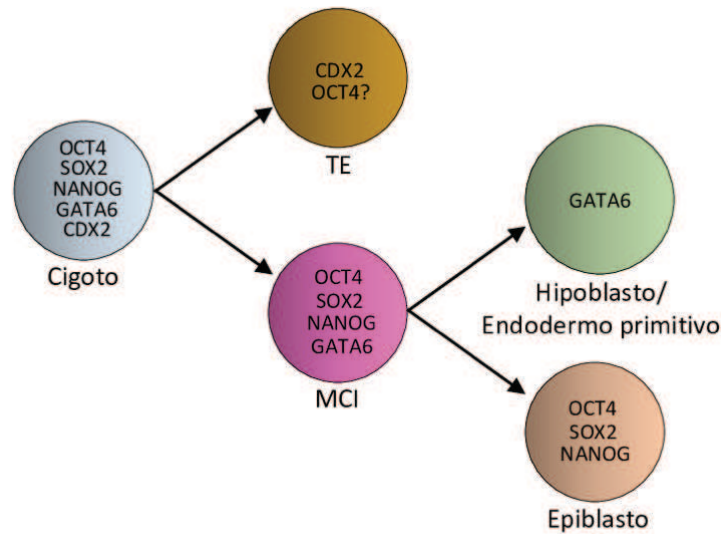
*Gata6* posee una función conservada entre distintas especies de mamíferos. Su expresión es observada previo a que se produzca la diferenciación hacia el endodermo primitivo o hipoblasto,



y únicamente aquellas células que retengan la expresión de este factor formarán el futuro endodermo primitivo o hipoblasto <sup>40</sup> (Figura 2). Su acción consiste en antagonizar a *Nanog* y controlar genes asociados con el endodermo primitivo <sup>41</sup>. En células madre embrionarias murinas y humanas deficientes en *Gata4* se ha observado una falla funcional del endodermo visceral, mientras que mutantes para *Gata6* poseen afectada la inducción de la diferenciación hacia el endodermo. Por el contrario, la expresión ectópica de *Gata4* o *Gata6* produce la activación de *Gata4* y *Gata6* endógenos e induce la diferenciación hacia derivados endodérmicos <sup>39,42-44</sup>.

Por otra parte, uno de los marcadores principales que se expresa en células del TE es el factor de transcripción *Cdx2* (del inglés “caudal-related homeobox 2”). Desde el estadio de mórula tardía, se ha observado que las células que expresan este factor serán las que darán origen al TE <sup>45,46</sup>. En murinos, *Oct4* antagoniza la transcripción de *Cdx2* en las células del MCI para que éstas no se diferencien hacia el TE; mientras que en las células del TE, *Cdx2* reprime la transcripción de *Oct4* para que éstas puedan originar membranas extraembrionarias <sup>9,47,48</sup>.

En ensayos donde se eliminó el gen *Oct4* en embriones murinos, tanto las células del MCI como del TE expresaban *Cdx2* <sup>49,50</sup>. Sin embargo, este efecto no ha sido observado en embriones bovinos ya que luego de la eliminación de *Oct4*, *Cdx2* fue únicamente detectado en las células del TE, indicando que *Oct4* no regula la expresión de *Cdx2* en esta especie <sup>33</sup> (Figura 2). En estudios de pérdida de función del gen *Cdx2* se ha observado que los embriones detienen su desarrollo poco después de la implantación, probablemente debido a defectos en el trofoblasto <sup>49</sup>. En células madre embrionarias, la expresión ectópica de *Cdx2* produce una rápida diferenciación hacia TE <sup>50</sup>. En concordancia, se ha observado que las células madre de trofoblasto expresan *Cdx2* <sup>51</sup>.



**Figura 2: Especificación celular durante el desarrollo.** Se esquematizan las distintas poblaciones celulares que se observan durante el desarrollo embrionario, junto a la expresión de los factores moleculares más representativos de cada población.

En conjunto, queda demostrado que el desarrollo embrionario implica una serie de eventos orquestados y finamente regulados por factores de transcripción, los cuales interactúan y se regulan entre sí, determinando la identidad celular.

### 1.3: Epigenética del desarrollo.

Durante el comienzo del desarrollo embrionario, las gametas sufren numerosas remodelaciones en su cromatina con el fin reestablecer su estado epigenético y de esta forma crear una célula totipotente que posea un patrón de expresión génica propio, lo que permitirá el progreso normal del desarrollo embrionario <sup>52</sup>. Estas remodelaciones involucran modificaciones epigenéticas las cuales regulan la expresión génica sin alterar la secuencia nucleotídica del ADN, son específicas en cada especie y suelen ser dirigidas por factores presentes en el oocito. Las principales modificaciones están dadas por la unión de ARN no codificantes, la metilación del ADN, cambios conformacionales de la cromatina, y modificaciones postraduccionales de histonas <sup>53</sup>. Cabe mencionar que la eliminación de marcas del genoma luego de la fecundación no es total pues existen algunas regiones génicas diferencialmente marcadas dependiendo de su origen parental (genes *imprinted*) y algunos retrotransposones que son excluidos de esta remodelación <sup>54</sup>.

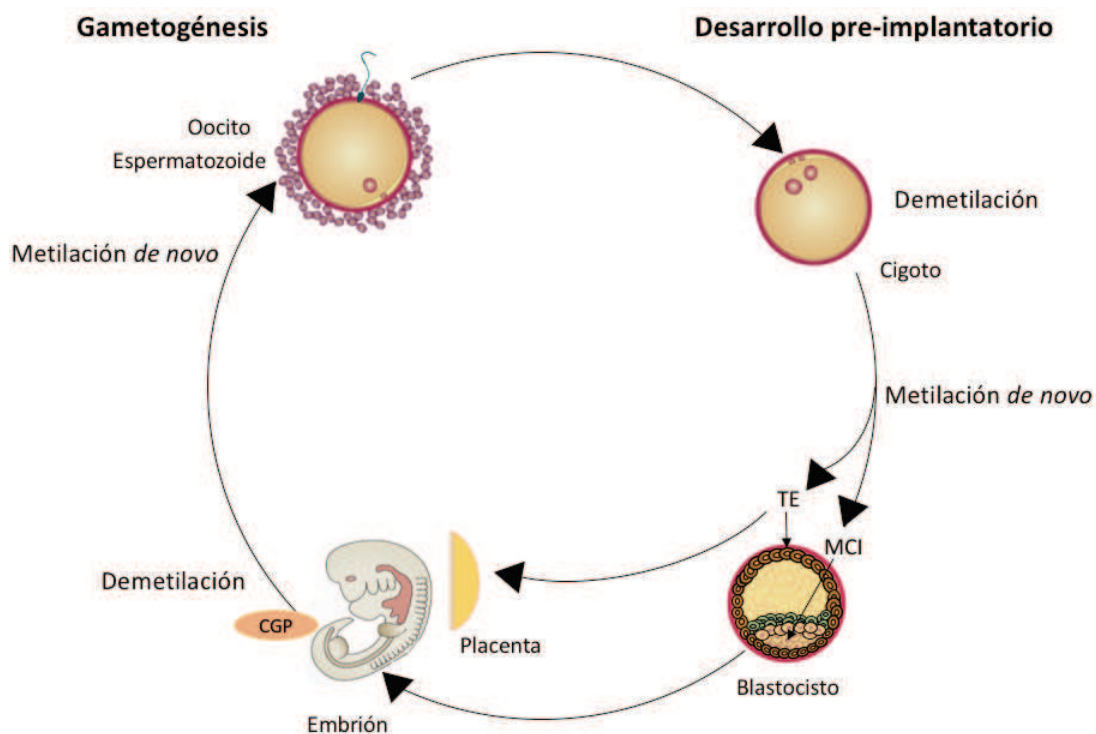
Los ARN no codificantes son fragmentos de ARN que son transcritos a partir de secuencias no codificantes del genoma y participan en la regulación de la expresión génica al interactuar con elementos reguladores del genoma, factores de transcripción y/o modificaciones epigenéticas. Según su longitud, pueden ser clasificados en microARNs o ARNs no codificantes largos. Numerosos ARN no codificantes han sido identificados por su participación durante el desarrollo, la inactivación del cromosoma X, el *imprinting* génico (genes marcados diferencialmente según su origen parental), y el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación celular <sup>55,56</sup>.

Otra de las modificaciones epigenéticas involucradas en la determinación de la identidad celular es la metilación del ADN. Este proceso consiste en la adición de un grupo metilo en el quinto carbono de los residuos de citosina del ADN (5-mC) y tiene como fin bloquear el acceso a regiones reguladoras del genoma, así como también reclutar en un sitio específico a represores transcripcionales y/o modificadores de la cromatina. La metilación del ADN está catalizada por metiltransferasas que cumplen dos funciones principales: las ADN metiltransferasas *de novo* como la DNMT3A y la DNMT3B que establecen nuevos patrones de metilación del ADN durante el desarrollo temprano; y las metiltransferasas de mantenimiento como la DNMT1 que copian esos patrones en las células hijas a medida que ocurre la división celular. Por el contrario, la demetilación de la citosina puede suceder de dos formas: de manera dependiente de la replicación del ADN en donde la marca se diluye a medida que las células se dividen; o por la conversión de la 5-mC a 5-hidroxi-metil-citosina (5-hmC) por acción de las enzimas TET, que mediante una serie de procesamientos bioquímicos concluyen en la obtención de una citosina no metilada en esa misma posición <sup>57</sup>. Generalmente, la metilación del ADN produce represión transcripcional, aunque se ha comprobado que su efecto represor depende de la ubicación en el genoma en donde ocurre la modificación. Por ejemplo, suele observarse que, si la metilación del ADN ocurre en la región codificante del gen, la transcripción del mismo se encuentra activa.

Durante el desarrollo, ocurren dos eventos de demetilación global con el fin de generar una nueva identidad en el incipiente genoma embrionario (Figura 3). La primera demetilación ocurre luego de la fecundación hasta el momento de la implantación, mientras que la segunda ocurre cuando se produce la formación de las células germinales primordiales, células que luego originarán las gametas. En la fecundación, los niveles de metilación del genoma paterno son eliminados rápida y activamente, mientras que la eliminación de las marcas del genoma materno ocurre de forma paulatina de manera dependiente de la replicación del ADN <sup>58</sup>. Luego de la primera demetilación

global y al momento en que se forma el MCI, ocurren eventos de metilación *de novo* los cuales determinarán la especificación de las tres capas germinales. Por otra parte, las células germinales (las cuales proceden de un subgrupo de células del epiblasto) experimentan una segunda ronda de reprogramación en donde las marcas de metilación recientemente depositadas son eliminadas y se reactivan genes específicos de estas células <sup>59</sup>.

Los sistemas de metilación/demetilación del ADN están finamente controlados por la acción de diversos factores capaces de interactuar con el ADN, como factores de transcripción, ARNs no codificantes y/o modificaciones de histonas <sup>60</sup>.



**Figura 3:** Ciclos de metilación/demetilación del ADN durante el desarrollo embrionario.

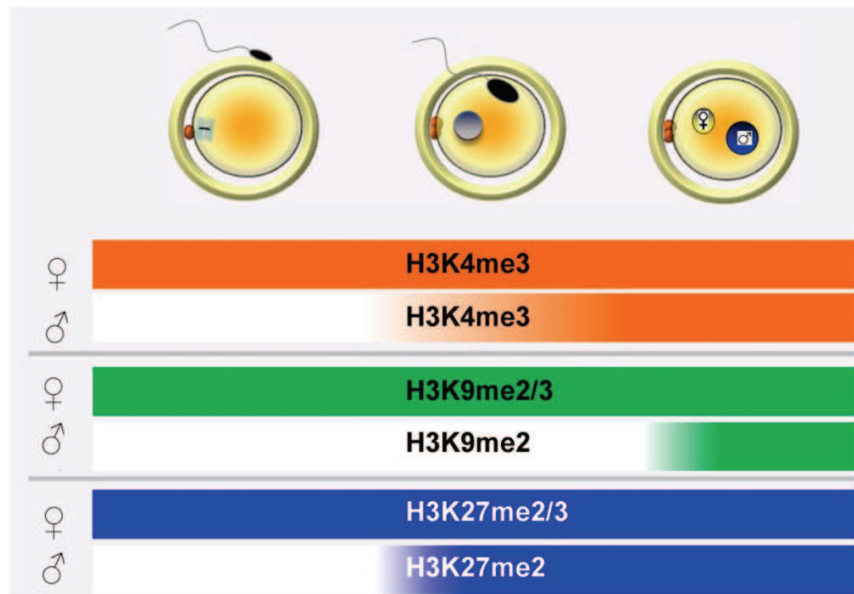
Además de la metilación del ADN, otras modificaciones epigenéticas como las modificaciones postraduccionales de histonas y la presencia de distintas variantes de histonas pueden afectar la conformación de la cromatina, modificando la transcripción génica. La cromatina se organiza en nucleosomas que consisten en segmentos de ADN (~147 pb) que envuelven un octámero de proteínas histonas (dos repeticiones de las histonas 2A (H2A), histonas 2B, histonas 3 (H3) e histonas 4, conectadas por la histona 1 <sup>61</sup>). En mamíferos, han sido identificadas distintas variantes

de histonas entre las cuales se encuentran variantes de la H3 como CENP-A y H3.3; variantes de la H2A como H2AZ, etc <sup>61</sup>. Además de existir distintas variantes de histonas, estas proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales en los extremos amino terminales (N- terminales) que permanecen por fuera del nucleosoma e incluyen modificaciones como la fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, metilación y acetilación <sup>62</sup>. Estas modificaciones pueden interactuar con factores de transcripción y elementos reguladores, modificando la expresión génica y la estructura de la cromatina, haciéndola más compacta (y por lo tanto menos accesible) o más relajada (y por lo tanto más permisiva). Generalmente, marcas como la acetilación suelen estar vinculadas con un estado de la cromatina relajado/permisivo, mientras que marcas como la metilación en residuos de arginina (R) o lisina (K) pueden ser asociadas tanto con la activación como con la represión de la expresión génica, dependiendo del sitio del genoma en el que ocurre la modificación (promotor, región codificante, etc) y del número de grupos metilo adheridos (mono-, di- o tri- metilados) <sup>62</sup>.

Las marcas de histonas sufren alteraciones dinámicas a lo largo del desarrollo con el fin de garantizar un correcto mantenimiento del epigenoma y la adquisición de una correcta identidad celular. Un claro ejemplo de esto ocurre al momento de la activación del genoma embrionario durante el desarrollo, donde ciertas marcas represivas son removidas y se adquieren marcas permisivas <sup>63</sup>. Estas modificaciones están reguladas por metiltransferasas (ej. EHMT1/2, SUV39H1/H2, SETDB1), demetilinas (ej. las proteínas de la familia KDM), acetiltransferasas (ej. las proteínas de la familia HAT), deacetilasas (ej. las proteínas de la familia HDAC), entre otras. La H3K4me3 es una de las marcas de histonas asociadas con la activación transcripcional, la cual suele ubicarse en regiones promotoras. Esta marca ha sido observada en niveles crecientes durante el proceso de maduración oocitaria, con el fin de formar un reservorio de ARNm el cual será indispensable para el embrión previo a que se produzca la activación de su genoma <sup>64</sup>. Por el contrario durante la generación de los espermatozoides, ocurre un reemplazo casi total de las histonas paternas por protaminas <sup>65</sup>, las cuales a su vez serán reemplazadas por histonas maternas rápidamente luego de la fecundación y serán posteriormente metiladas en la posición H3K4 (Figura 4). En mamíferos, mediante estudios de pérdida de función de las proteínas encargadas de colocar o remover esta marca, se ha observado que niveles adecuados de la misma son imprescindibles para una correcta activación del genoma embrionario y un eficiente desarrollo <sup>66-69</sup>.

Una de las modificaciones de histonas que suele co-localizar en regiones promotoras con la H3K4me3, es la H3K27me3 la cual está asociada al silenciamiento transcripcional y suele reprimir la expresión de genes importantes para el desarrollo durante la diferenciación celular. La presencia de ambas marcas en regiones promotoras conforma regiones denominadas “dominios bivalentes”, las cuales cumplen la función de brindar un escenario flexible y dinámico para la activación o represión de genes involucrados en el desarrollo. La H3K27me3 se encuentra en altos niveles en el genoma materno, aunque luego de la fecundación esta marca decae gradualmente (permitiendo la reactivación de genes silenciados) y luego vuelve a aumentar en el estadio de blastocisto a niveles similares a los detectados en el oocito <sup>70,71</sup> (Figura 4). En mamíferos, se ha observado que los niveles de la marca H3K27me3 tienen un efecto sobre la activación del genoma embrionario, la tasa de obtención de blastocistos y la implantación <sup>72</sup>.

La H3K9me3 es otra de las modificaciones epigenéticas asociada con el silenciamiento transcripcional y con la formación de la heterocromatina. La remodelación de la metilación de la H3K9 suele ocurrir de forma paralela y similar a la metilación del ADN <sup>73</sup>. Luego de la fecundación, la H3K9me3 es eliminada de las regiones promotoras creando un entorno epigenético menos restringido, permitiendo que el cigoto alcance el estado totipotente y la correcta activación de su genoma. Luego de la activación del genoma embrionario, los niveles de H3K9me3 aumentan gradualmente en regiones LTR (del inglés “*Long Terminal Repeat*”), mientras que en regiones promotoras los niveles de H3K9me3 son restaurados en estadios previos a la implantación <sup>74,75</sup> (Figura 4). En mamíferos, se ha demostrado que la eliminación total o parcial de las proteínas encargadas de controlar el estado de metilación de la H3K9me3 concluye en el detenimiento del desarrollo, inestabilidad cromosómica y/o en letalidad embrionaria <sup>74,76–79</sup>.



**Figura 4:** Remodelación de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me2/3 y H3K27me3 en el cigoto. Figura de Canovas y Ross, 2017 <sup>80</sup>.

Vale aclarar que las modificaciones epigenéticas previamente mencionadas funcionan de forma compleja e interconectada con el fin de controlar la expresión génica y, por lo tanto, procesos celulares como el desarrollo, la diferenciación e incluso el desarrollo de patologías. Conocer en profundidad los mecanismos y procesos epigenéticos que ocurren durante la embriogénesis temprana nos brindará herramientas para poder hacer intervenciones destinadas a mejorar la salud y productividad animal. Además, nos permitirá conocer el impacto que podría tener el uso de las biotecnologías reproductivas sobre un individuo a corto y a largo plazo.

#### 1.4: Biotecnologías reproductivas.

La biotecnología de la reproducción comprende a la técnica o conjunto de ellas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. Gracias a un mayor entendimiento de la biología del desarrollo y al avance científico-tecnológico, dichas técnicas fueron evolucionando a través de los años en su grado de complejidad, y fueron clasificadas en cinco generaciones que comprenden desde la inseminación artificial hasta la transferencia nuclear de células somáticas y células madre <sup>81</sup> (Tabla I).

**Tabla I: Desarrollo generacional de las biotecnologías reproductivas.** Tabla adaptada de Palma, 2001<sup>82</sup>.

Biotecnologías reproductivas	
Primera generación <b>1908</b>	Inseminación artificial
Segunda generación <b>1970</b>	Control hormonal de la ovulación Transferencia embrionaria
Tercera generación <b>1980</b>	Sexado de embriones y espermatozoides Producción <i>in vitro</i> de embriones
Cuarta generación <b>1990</b>	Transferencia nuclear de células somáticas
Quinta generación <b>2000</b>	Transgénesis Células madre

La primera generación, comenzó en el siglo XII con la aplicación de inseminación artificial (IA) la cual se basa en introducir semen en el aparato reproductor femenino para que se produzca la fecundación y posteriormente el desarrollo embrionario. Esta técnica, es actualmente la técnica reproductiva más utilizada en todo el mundo y cuenta con la ventaja de que se optimiza el uso del semen ya que se requieren bajas dosis espermáticas, se evita la propagación de enfermedades infecciosas transmisibles a través de la cópula, y en conjunto con la criopreservación de semen, permite la diseminación de una genética de interés <sup>82</sup>.

La segunda generación, se caracterizó por la aplicación de tecnologías que permitieron controlar la actividad reproductiva de las hembras, mediante programas de ovulación, súper-ovulación y transferencia embrionaria. Estas tecnologías permiten sincronizar el celo y utilizar la IA de forma más eficiente, facilitan la reinscripción de hembras lactantes o en anestro posparto al ciclo reproductivo, y permiten programar el momento del parto <sup>83,84</sup>.

La tercera generación de las biotecnologías reproductivas tuvo lugar alrededor de los años 80, y fue caracterizada por el sexado de espermatozoides y embriones, y por la producción *in vitro* de embriones. Por un lado, contar con la posibilidad de seleccionar el sexo de las gametas masculinas resultó de gran utilidad en sistemas de producción cuya rentabilidad depende de un mayor número de reproductores de un determinado sexo (por ej. hembras para la producción de leche). Por otro lado, la producción *in vitro* de embriones mediante la fecundación *in vitro* (FIV) revolucionó al sector agropecuario al permitir la producción de embriones de forma masiva, aumentando el



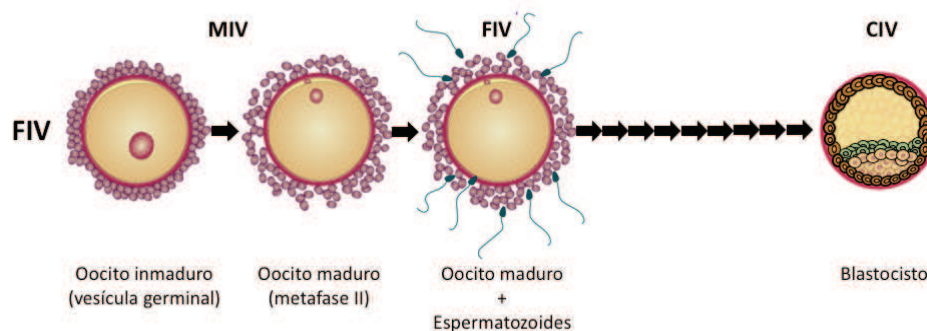
número de crías anuales por animal, y permitiendo la generación de embriones a partir de la fecundación de oocitos obtenidos por aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, del inglés “*Ovum Pick-Up*”) o provenientes de animales faenados <sup>82</sup>. El primer reporte de producción *in vitro* de embriones fue en el año 1970, cuando se fecundaron oocitos madurados *in vitro* con espermatozoides pre-incubados <sup>85</sup>. Sin embargo, el primer proceso realizado totalmente *in vitro* fue recién en el año 1987 <sup>86</sup>.

El objetivo de la FIV se basa en lograr producir embriones *in vitro* imitando los eventos fisiológicos que ocurren durante la fecundación y el desarrollo pre-implantatorio *in vivo*. Estos eventos se resumen en tres etapas, donde el éxito o el fracaso de cada una de ellas depende de la etapa anterior. Estas etapas son: la maduración oocitaria *in vitro* (MIV), la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo embrionario *in vitro* (CIV) <sup>82</sup>.

Durante la MIV se produce la maduración tanto nuclear como citoplasmática del oocito y la expansión de las células del cúmulus que rodean al oocito. Mediante el uso de hormonas y factores de crecimiento se logra por un lado, que se active al factor promotor de la maduración (FPM) para que el oocito en el estadio de vesícula germinal y retenido en la profase I de la meiosis I, reasuma la meiosis hasta alcanzar el estadio de metafase II de la meiosis II, liberando el primer corpúsculo polar (CPI) <sup>87</sup>. Por otro lado, durante la maduración citoplasmática, el oocito sufre re-arreglos en la distribución y el número de organelas, y almacena ARNm y proteínas maternas <sup>87</sup>. El fin de la maduración radica en obtener un oocito competente, es decir, que sea capaz de dirigir y mantener el desarrollo embrionario. Generalmente en la especie bovina, se alcanzan valores de entre el 80-90% de maduración *in vitro*, evaluando únicamente la maduración nuclear <sup>88,89</sup>. En la siguiente etapa, los oocitos maduros con el cúmulus expandido son co-incubados con espermatozoides para que se produzca el proceso de fecundación *in vitro* <sup>90</sup>. Para que esto suceda, los espermatozoides deben ser previamente capacitados con el fin de adquirir capacidad fecundante. Este proceso suele ser inducido mediante la adición de componentes químicos al medio de cultivo como por ejemplo la heparina en el caso de la especie bovina <sup>90</sup>. Posteriormente, una vez que ocurre la penetración del espermatozoide, el oocito reanuda y completa la meiosis, liberando el segundo cuerpo polar, y se forman los pronúcleos parentales que conforman la estructura del cigoto el cual poseerá el material genético proveniente de ambas gametas. La eficiencia del proceso de FIV suele rondar entre el 70-85% para la especie bovina <sup>89</sup>. Los presuntos cigotos son a continuación desnudados con el fin de remover las células del cúmulus, y cultivados *in vitro* durante 7 u 8 días, dando lugar

a la tercera y última etapa de este proceso. Durante el CIV los presuntos cigotos atraviesan sucesivas divisiones mitóticas asimétricas hasta alcanzar el estadio de blastocisto o blastocisto expandido, momento en el cual el embrión está preparado para ser criopreservado o transferido al endometrio de una hembra receptora sincronizada para que se produzca la implantación. En bovinos, alrededor de un 20-50% de los presuntos cigotos logran alcanzar el estadio de blastocisto <sup>91</sup>.

Desde el desarrollo de esta tecnología, se han realizado numerosas modificaciones en los medios y condiciones de cultivo, como el uso de co-cultivos con células oviductales, el uso de antioxidantes, factores de crecimiento, moduladores de AMPc, etc; con el fin de mejorar la calidad de las gametas y la producción y calidad de los embriones producidos *in vitro* <sup>92</sup>. En la especie bovina, esta técnica posee una eficiencia cercana al 50% de terneros sanos nacidos por cada embrión transferido <sup>93</sup>. Dentro de las biotecnologías reproductivas *in vitro*, esta técnica es la que reproduce de forma más fiel al proceso que ocurre *in vivo* ya que involucra la unión azarosa de las dos gametas para generar una célula totipotente conocida como el cigoto (Figura 5).



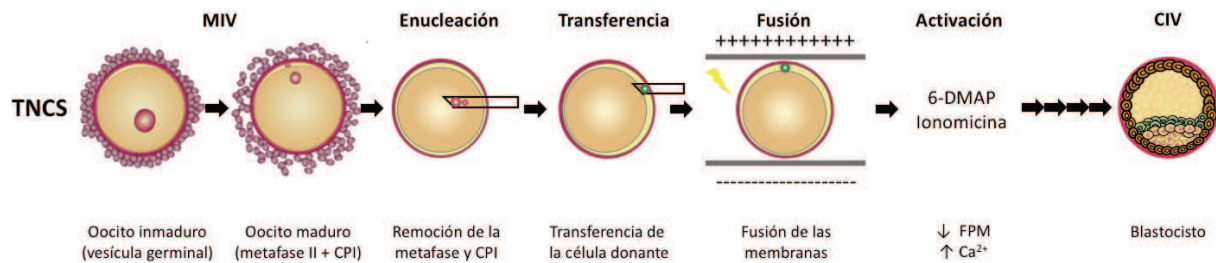
**Figura 5:** Esquema de producción *in vitro* de embriones mediante FIV.

La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) o clonación se ubica dentro de la cuarta generación de las biotecnologías reproductivas. Esta técnica consiste en remover el material genético de un oocito y luego introducir en el espacio perivitelino del mismo una célula del organismo a ser clonado. De esta forma, es posible producir un embrión genéticamente idéntico al donante celular, de manera asexual. Los inicios de esta técnica se remontan al año 1935 cuando Hans Spemann demostró que es el núcleo el responsable de dirigir la división celular, al separar con un cabello las dos células de un embrión de salamandra y obtener un individuo de cada una <sup>94</sup>.

En base a esto, propuso un experimento que consistía en reemplazar el núcleo de un oocito por el núcleo proveniente de una célula diferenciada. Este experimento, fue llevado a cabo en el año 1962 cuando John Gurdon logró crear clones de rana al transferir el núcleo de una célula epitelial intestinal de rana al citoplasma de un oocito enucleado <sup>95</sup>. Más tarde, en el año 1996 con el nacimiento de la oveja Dolly, se demostró que esta técnica podía ser extrapolada a otras especies, incluyendo mamíferos <sup>96</sup>.

Durante la TNCS, se realizan 3 etapas sucesivas que involucran: la MIV del oocito, la TNCS propiamente dicha y el CIV de los presuntos clones hasta que alcancen el estadio de blastocisto <sup>97</sup>. Las etapas de MIV y CIV se realizan de forma idéntica a la producción *in vitro* de embriones mediante FIV mientras que la TNCS se divide a su vez en 4 etapas: la enucleación del oocito, la transferencia del núcleo donante, la fusión de las membranas y la activación oocitaria. La enucleación consiste en extraer el material genético (metafase II y primer corpúsculo polar) del oocito maduro <sup>97</sup>. A continuación, se realiza la transferencia del núcleo donante proveniente del individuo a ser clonado. Para ello, se utilizan células (por ej. fibroblastos) sincronizadas en la fase G0/G1 del ciclo celular (de manera que posean un contenido genómico diploide y estén sincronizadas con el ciclo celular del oocito), y se las introduce en el espacio perivitelino del oocito enucleado <sup>97</sup>. Luego, se deben fusionar la membrana del oocito con la membrana de la célula donante, lo cual es generalmente llevado a cabo mediante la descarga de un pulso eléctrico <sup>97</sup>. Cuando se produce la fusión, ocurre la ruptura de la membrana nuclear de la célula donante y, gracias a los FPM presentes en el citoplasma oocitario, los cromosomas adoptan rápidamente una distribución similar a la observada en la metafase <sup>96</sup>. Finalmente, para que el oocito vuelva a reasumir la meiosis y de lugar a la formación de un embrión, debe producirse la activación del oocito reconstruido <sup>97</sup>. Durante el proceso de activación, se intentan imitar los mecanismos que ocurren cuando un oocito es fecundado, entre los cuales se encuentran la liberación oscilatoria de calcio y la degradación de los FPM <sup>98</sup>. Para ello, se pueden utilizar ionóforos de calcio como la ionomicina, que producen la liberación de calcio en el oocito, y el 6-di-metil-amino-purina (6-DMAP) que tiene como fin inhibir la actividad de los FPM. Una vez activado, el genoma proveniente de la célula donante entra en la fase G1, se forma la membrana nuclear y el pseudo-pronúcleo el cual se expande debido a la incorporación de proteínas maternas que cambian la estructura de la cromatina <sup>99</sup>. A continuación, comienza la replicación del material genético y las

sucesivas divisiones mitóticas que darán origen a las distintas blastómeras que conformarán al embrión (Figura 6).



**Figura 6: Esquema de producción *in vitro* de embriones mediante TNCS.**

Para la mayoría de los mamíferos, la eficiencia de la TNCS ronda entre el 0-10% de embriones transferidos que resultan en una descendencia viable <sup>100,101</sup>. Esta baja eficiencia suele estar asociada con aberraciones tanto en estadios pre- y/o post-implantatorios, como por ejemplo durante la activación del genoma embrionario, la implantación (debido a problemas en la formación de la placenta), e incluso después del nacimiento (problemas respiratorios, cardiacos, etc en el neonato) <sup>102-104</sup>. Pese a esto, en la actualidad, se han logrado clonar mediante TNCS más de 20 especies entre las cuales se encuentran: ratones, monos, humanos, cerdos, caballos, cabras, vacas, entre otras <sup>104</sup>. Las aplicaciones de la TNCS en reproducción animal se extienden a la conservación de especies en peligro de extinción o de animales de alto valor económico, y a la creación de organismos genéticamente modificados o transgénicos.

La creación de organismos transgénicos junto con los avances en la tecnología de células madre dieron lugar a la quinta generación de las biotecnologías reproductivas <sup>82</sup>. Las células madre se definen como aquella célula capaz de dividirse y dar origen a una copia de sí misma y a la vez, a una célula diferenciada; y son consideradas como excelentes candidatas para su uso en medicina regenerativa, testeo de drogas, modelo de estudio del desarrollo y modelado de enfermedades <sup>82</sup>. Dependiendo de la cantidad de linajes que una célula madre pueda originar se define su potencia <sup>105</sup>. De esta forma, las células madre con mayor potencia son las células madre totipotentes las cuales son capaces de generar un organismo nuevo ya que pueden originar todos los tejidos presentes en un embrión y en un individuo adulto, incluyendo tejidos extraembrionarios y a las células germinales <sup>105</sup>. A continuación, en escala decreciente del grado de potencialidad, se ubican las células madre pluripotentes las cuales pueden originar todos los tipos celulares presentes en un

embrión y en un organismo adulto, pero no son capaces de originar las estructuras extraembrionarias <sup>105</sup>. Seguidamente, se encuentran las células multipotentes las cuales pueden generar distintos tipos celulares dentro de un mismo linaje, como por ejemplo las células madre hematopoyéticas que son capaces de originar de manera exclusiva diferentes tipos celulares del linaje sanguíneo <sup>105</sup>. Finalmente, con el menor grado de potencia, se encuentran las células unipotentes o progenitoras, las cuales pueden dar origen a un solo tipo celular. Un claro ejemplo de estas últimas son las espermatogonias (células progenitoras de espermatozoides) las cuales únicamente podrán diferenciarse a espermatozoides <sup>105</sup>.

Las biotecnologías reproductivas aquí expuestas son actualmente utilizadas en todo el mundo, y han significado un enorme avance en los sistemas de producción y en la medicina humana y animal. A lo largo de esta tesis, nos hemos focalizado en las últimas generaciones de las biotecnologías reproductivas, haciendo hincapié en las técnicas de FIV, TNCS y células madre.

### **1.5: Células madre pluripotentes.**

Las células madre pluripotentes (CMP) componen el MCI de un blastocisto y persisten hasta la formación de las tres capas embrionarias durante la gastrulación. Como fue mencionado anteriormente, estas células se caracterizan por su capacidad de auto-renovación ilimitada y por su capacidad de diferenciarse a todos los tejidos presentes en un organismo adulto. En mamíferos, las primeras CMP en ser descritas fueron las células madre embrionarias de la especie murina las cuales fueron derivadas a partir del MCI de un blastocisto de ratón <sup>106,107</sup>. Estas células mostraron poseer una gran capacidad proliferativa sin sufrir alteraciones genómicas, junto con la capacidad de poder formar organismos quimeras ya que, al ser introducidas en un blastocisto, éstas eran capaces de colonizar el MCI y contribuir a la formación de todos los tejidos presentes en el futuro organismo, incluyendo la línea germinal. La capacidad de contribución de estas células al linaje germinal facilitó la producción de ratones transgénicos o genéticamente modificados debido a que las múltiples ediciones genéticas podían ser transmitidas a la progenie <sup>108</sup>. Aproximadamente 20 años más tarde, se lograron establecer las primeras líneas de células madre embrionarias derivadas de primates y, posteriormente de humanos <sup>109,110</sup>. Al igual que en la especie murina, estas células demostraron una proliferación ilimitada y la capacidad de formar teratomas que contenían tejidos derivados de las tres capas embrionarias luego de ser inyectadas en ratones inmunodeficientes.

Finalmente en el año 2008, se lograron obtener células madre embrionarias a partir de blastocistos de rata <sup>111,112</sup> mientras que en especies de granja se lograron resultados exitosos hace sólo tres años atrás <sup>113</sup>. Las células madre embrionarias reportadas para las diferentes especies han sido derivadas a partir de embriones producidos *in vivo* e *in vitro* mediante diversas técnicas de biotecnologías reproductivas como la FIV, TNCS, activación partenogenética, e incluso a partir de embriones criopreservados <sup>113</sup>.

Inicialmente, las líneas de células madre embrionarias obtenidas (independientemente de la especie) eran consideradas equivalentes dado que todas eran derivadas a partir del cultivo del MCI de un blastocisto. Sin embargo, luego se observó que existían numerosas diferencias entre ellas como la morfología, las condiciones de cultivo y factores de crecimiento necesarios para mantener su estado indiferenciado <sup>114</sup>. En el año 2007, fueron aisladas las células madre de epiblasto (EpiSC, del inglés “*Epiblast-derived Stem Cells*”) a partir de embriones de ratón que se encontraban en un estadio post-implantatorio <sup>115</sup>. Las EpiSC presentaban una morfología y requerimientos de cultivo similares a las células madre embrionarias humanas, pero diferente al de las células madre embrionarias murinas. De esta forma, gracias a la derivación de las EpiSC, las células madre dejaron de ser consideradas equivalentes y fueron clasificadas según su grado de desarrollo, siendo las células madre embrionarias murinas representativas de un estadio menos avanzado del desarrollo denominado estado *naive*, y las células madre embrionarias humanas y EpiSC de ratón representativas de un estadio más avanzado del desarrollo denominado estado *primed* <sup>115-117</sup>.

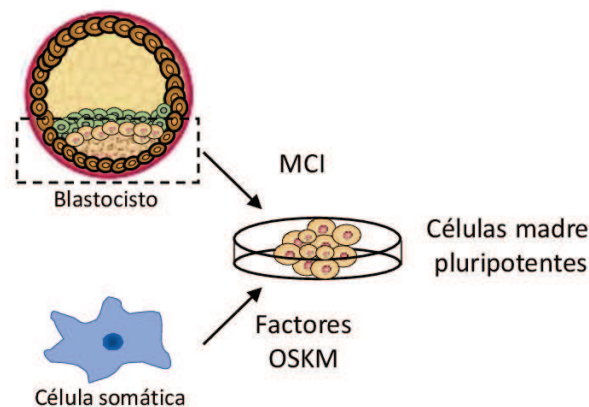
Las células madre *naive* recrean el estadio embrionario de un epiblasto pre- o peri-implantatorio y se caracterizan por crecer en colonias compactas tridimensionales, expresar E-caderina (proteína de adhesión célula-célula) la cual cumple un rol esencial en evitar la diferenciación de las células, poseer alta clonogenicidad, y tolerar la disociación enzimática a nivel unicelular. Además, expresan marcadores tempranos del desarrollo como *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf2/4/5*, *Tfcp2l1*, *Tbx3*, *Esrrb* y *Rex1* <sup>118-120</sup>. Para mantener su auto-renovación y su estado indiferenciado, estas células dependen del factor inhibidor de leucemina (LIF) el cual estimula la vía de señalización JAK/STAT3, y de la inhibición simultánea de la quinasa glucógeno sintasa 3b (GSK3b) y de la quinasa reguladora de señal extracelular (ERK)/quinasa activada por mitógenos (MAPK) <sup>121</sup>. Adicionalmente, las células de sexo femenino poseen dos cromosomas X activos lo cual es representativo de un estadio embrionario temprano ya que, durante el estadio de epiblasto temprano, el cromosoma X de origen paterno (el cual se encuentra inactivado) es reactivado hasta

luego de la implantación, y más tarde se inactiva nuevamente para evitar la expresión de genes por duplicado <sup>121</sup>. Finalmente, estas células son capaces de formar teratomas al ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos, y de contribuir eficientemente a la formación de organismos quimera, corroborando una vez más el estadio temprano del desarrollo que estas células recrean <sup>121-125</sup>.

Por el contrario, las células madre *primed* poseen características de células provenientes del epiblasto post-implantatorio en estadio de peri-gastrulación. Su crecimiento es en colonias planas bidimensionales, expresan la proteína Integrina (proteína de adhesión célula-matriz extracelular) la cual es la responsable de favorecer la auto-renovación celular, poseen baja clonogenicidad, y no resisten disociaciones enzimáticas ya que la falta de adhesión lateral célula-célula desencadena un proceso de apoptosis <sup>34,115</sup>. La auto-renovación y estado indiferenciado de las células está dirigido por acción del FGF2 junto con las proteínas de la superfamilia de TGFβ: TGFβ, Activina A y Nodal <sup>34,115</sup>. Además, las células de sexo femenino poseen uno de sus cromosomas sexuales inactivado lo cual refleja que reproducen un estadio embrionario más avanzado en comparación a las células madre *naive* <sup>34,115</sup>. Finalmente, estas células poseen la capacidad de formar teratomas *in vivo* aunque no contribuyen eficientemente a la formación de organismos quimera <sup>34,115,126,127</sup>.

Actualmente se han desarrollado estrategias para alternar entre los estados *naive* y *primed* entre las cuales se encuentran la expresión ectópica de factores de pluripotencia como *Klf4* y *Klf2* <sup>128-131</sup>; cambios en la concentración de oxígeno durante el cultivo <sup>132,133</sup>, el agregado de citoquinas y factores de crecimiento como LIF, Activina A/Nodal/FGF2, el uso de inhibidores de las vías de señalización de GSK3b, MEK y p38 <sup>134-139</sup>, entre otros. Incluso, se han descrito nuevos estados de pluripotencia los cuales varían en su potencialidad, siendo algunos más semejantes a un estado totipotente mientras que otros son estados intermedios entre el estado *naive* y *primed*, o variaciones de este último <sup>34,140-144</sup>. Algunos de estos estados son: “estado similar a un embrión de 2 células” donde las células poseen un perfil de expresión similar a embriones de 2 células <sup>145-149</sup>, “células madre pluripotentes de potencial expandido (EPSC)” que poseen la capacidad de diferenciarse hacia tejidos embrionarios y extraembrionarios <sup>150-156</sup>, “células madre tipo epiblasto (EpiLSCs)” y “células madre pluripotentes intermedias” que comparten características con el estado *naive* y *primed* y pueden diferenciarse a células germinales primordiales <sup>141,157-167</sup>, y “células madre pluripotentes de región selectiva (rsPSCs)” que clasifican como un estado alternativo dentro del estado *primed* y son capaces de contribuir a la parte posterior de un epiblasto de ratón en la etapa de peri-gastrulación <sup>140</sup>.

Además de las células madre embrionarias y de los estados de pluripotencia que pudieron ser obtenidos *in vitro*, en el año 2006, un nuevo método para la obtención de células madre pluripotentes revolucionó este campo de estudio al demostrarse que se podían obtener CMP a partir de la reprogramación de células somáticas sin la necesidad de usar embriones. Takahashi y Yamanaka mostraron que la expresión ectópica de únicamente 4 factores de transcripción (conocidos como OSKM que hace referencia a los factores *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*) era suficiente para reprogramar fibroblastos murinos hacia un estado pluripotente, dando origen a las células madre pluripotentes inducidas (CMPI) <sup>168</sup>. Un año más tarde, se lograron obtener CMPI humanas a partir de la transducción de fibroblastos epidérmicos con los factores OSKM <sup>169</sup> u *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* <sup>170</sup>. Hoy en día se encuentran disponibles CMPI de diversas especies, aunque al igual que lo ocurrido para las células madre embrionarias, su obtención a partir de especies de granja ha sido lograda recientemente (Figura 7).



**Figura 7:** Origen de las células madre pluripotentes embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas.

Las CMPI se asemejan a las células madre embrionarias en cuanto a su potencialidad, capacidad de auto-renovación, morfología y mantenimiento. Sin embargo, numerosos estudios demostraron que estos dos tipos celulares no son idénticos ya que se observaron diferencias en la expresión génica las cuales podrían ser producto del origen de la población celular utilizada, de la metodología de reprogramación aplicada, las condiciones de cultivo empleadas y/o del grado de reprogramación alcanzado <sup>171-176</sup>. Los primeros métodos de reprogramación para la obtención de CMPI consistían en el uso de métodos integrativos que incluían lentivirus o retrovirus para inducir



la expresión de los factores de pluripotencia. Sin embargo, estos métodos quedaron obsoletos y comenzaron a utilizarse métodos no integrativos como la transfección de ARNm o proteínas, vectores episomales, sistemas virales no integrativos como el adenovirus, entre otros <sup>177-186</sup>. También se han incluido durante la reprogramación moléculas modificadoras del estado epigenético con el fin de aumentar la eficiencia y el éxito del proceso <sup>184,185</sup>. Una de las principales ventajas de las CMPI es que no requiere utilizar embriones, evitando problemas bioéticos o restricciones legales. Por otro lado, en el marco de la medicina regenerativa o terapia celular tanto en humanos como en animales, estas células pueden ser derivadas en forma paciente-específico, evitando el rechazo inmunológico lo cual las convierte en excelentes candidatas a ser empleadas en este tipo de terapias.

En conjunto, el cultivo *in vitro* de las células madre pluripotentes (embrionarias e inducidas) permitió perpetuar indefinidamente un estadio embrionario que naturalmente ocurre en una ventana temporal acotada durante el desarrollo. De esta forma, constituyen un gran modelo *in vitro* capaz de recapitular de manera fiel los eventos que ocurren durante la embriogénesis, permitiendo estudiar los mecanismos celulares y moleculares que definen la especificación tisular durante el desarrollo embrionario.

## **1.6: Células madre pluripotentes bovinas y su relación con la vía de señalización de Wnt.**

Los intentos por obtener células madre pluripotentes de animales de granja comenzaron pocos años después de la primera derivación de células madre embrionarias de ratón. En el año 1987, se reportaron los primeros ensayos para derivar líneas de células madre embrionarias de oveja <sup>187</sup>, y posteriormente hubo numerosos intentos en la especie bovina, porcina y caprina <sup>113</sup>. Sin embargo, todos fracasaron ya que la mayoría de las líneas sólo pudieron ser cultivadas *in vitro* por períodos de tiempo cortos. Además presentaron poca o nula caracterización que validara su pluripotencia, ya que expresaban tan sólo algunos marcadores de pluripotencia, y no fueron capaces de generar teratomas con derivados de las tres capas embrionarias, o de contribuir a la formación de quimeras <sup>113,188</sup>. La razón de estos fracasos radicó en que, en general, se utilizaron condiciones de cultivo similares a las empleadas para el cultivo de células madre embrionarias murinas o humanas las cuales incluían medios basales, factores de crecimiento, inhibidores y

suplementos proteicos que no eran adecuados para el mantenimiento de la pluripotencia de estas especies. Si bien en pocas ocasiones, se lograron obtener células madre embrionarias más estables a lo largo del tiempo (en caprinos<sup>189</sup> u ovinos<sup>190</sup> por ejemplo), en términos generales, las líneas obtenidas no lograban mostrar verdadera pluripotencia *in vivo*. Únicamente mediante manipulación genética fue posible derivar líneas de la especie porcina<sup>191</sup> y bovina<sup>192</sup> con la capacidad de formar teratomas, validando su estado pluripotente.

A los intentos por obtener células madre embrionarias, y con el descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas murinas y humanas, se sumó la obtención de CMPI de animales de granja. Similar a lo ocurrido para la obtención de células madre embrionarias, los factores de reprogramación como las condiciones de cultivo se asemejaban a aquellas utilizadas en murinos y humanos. En este caso, gracias a la expresión constante de los factores de reprogramación, las células expresaban marcadores de pluripotencia de forma estable por varios pasajes y eran capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, no se han reportado líneas de animales de granja que en ausencia de la expresión de los factores de reprogramación lograran mantener su estado pluripotente<sup>113,188</sup>.

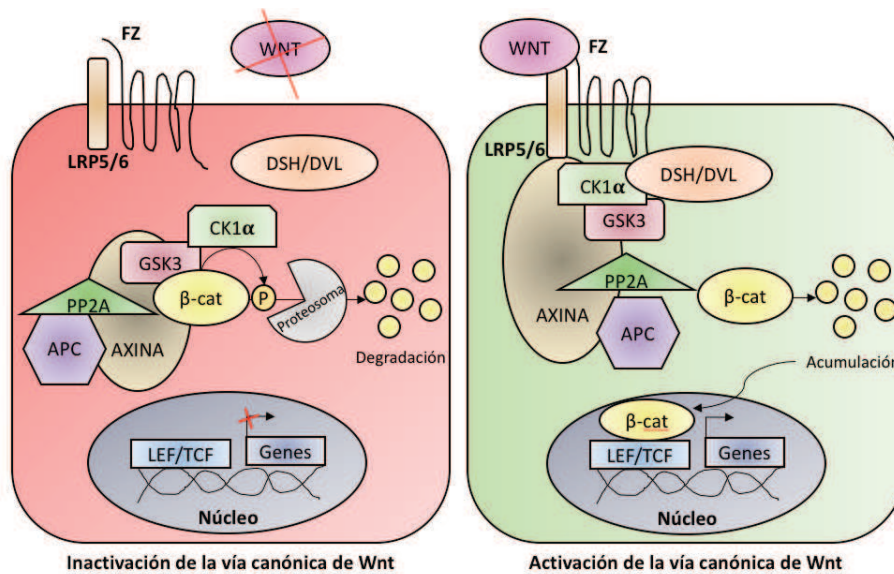
En conjunto, estos antecedentes indican que si bien los intentos para obtener células madre pluripotentes en animales de granja, ya sea a partir de embriones o de células reprogramadas, comenzaron poco tiempo después de la primera derivación de células madre pluripotentes murinas, las condiciones de cultivo empleadas no fueron óptimas para lograr mantener la pluripotencia de estas especies en forma estable *in vitro*. De hecho, gracias al conocimiento adquirido durante los últimos años acerca del estado pluripotente, la obtención de verdaderas células madre pluripotentes en especies de granja pudo ser lograda recientemente en bovinos (2018<sup>193</sup> y 2021<sup>154,194,195</sup>), porcinos (2019)<sup>153,196</sup>, ovinos (2020)<sup>197</sup> y equinos (2021)<sup>159</sup> utilizando condiciones de cultivo que involucran la modulación de las vías de señalización de FGF2, TGF $\beta$  y WNT.

En el año 2018, fue reportada la primera derivación exitosa de células madre embrionarias bovinas (CMEB)<sup>193</sup>. Las condiciones de cultivo utilizadas resultaron similares a las requeridas para el cultivo de células madre pluripotentes humanas de región selectiva<sup>140</sup>, e involucraban la utilización de un medio basal denominado CTFR (que a su vez resulta similar en su formulación al medio de cultivo comercial mTeSR1), suplementado con 20 ng/mL de FGF2 y 2,5  $\mu$ M del inhibidor de la vía de Wnt IWR1, junto con el uso de iMEF como capa nutricia. En estas condiciones, los autores demostraron la capacidad de derivar líneas estables de CMEB (llamadas

CTFR-CMEB) con alta eficiencia, a partir de embriones de distintas razas producidos por FIV, OPU-FIV y TNCS/TN (para los cuales se utilizaron células somáticas o células madre embrionarias como donantes nucleares, respectivamente). Las líneas establecidas crecieron en colonias planas con bordes irregulares, fueron fácilmente disociadas mediante acción enzimática, y se mantuvieron estables por numerosos pasajes (>70), conservando su estabilidad genética, tiempo de duplicación, marcadores de pluripotencia y perfil transcriptómico, el cual se asemejaba con el estado *primed*. Finalmente, las células mostraron capacidad para formar teratomas *in vivo* que contenían derivados de las tres capas embrionarias.

Es importante destacar que si bien existe evidencia de que las vías de señalización Nodal/Activina A y FGF se encuentran activas durante el desarrollo del epiblasto de embriones bovinos <sup>198</sup>, y por lo tanto podrían estar involucradas en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre, el requerimiento de la inactivación de la vía de Wnt resultó menos predecible. En las líneas CTFR-CMEB y en las recientemente derivadas células madre pluripotentes bovinas de potencial expandido <sup>154,194</sup> e inducidas <sup>196</sup>, y al igual que en otras especies de granja como porcinos <sup>153,196</sup> y ovinos <sup>197</sup>, fue necesario utilizar al inhibidor de la vía de Wnt IWR1 (u otros inhibidores análogos) para derivar y mantener de forma estable células madre pluripotentes bovinas libres de transgenes. La vía de Wnt se encuentra altamente conservada en metazoos y está involucrada en la regulación de diversos procesos celulares entre los cuales se destacan la determinación del destino celular, migración, polaridad, renovación o proliferación celular, formación del eje primario y organogénesis <sup>199</sup>. Los miembros de la familia de Wnt son glicoproteínas secretadas que se unen al dominio extracelular N-terminal rico en cisteína de la familia de receptores *Frizzled* (FZ). La proteína FZ es una proteína transmembrana de siete tramos con homología topológica a receptores acoplados a proteína G <sup>200</sup>. Además de la interacción entre Wnt y FZ, se requieren co-receptores para mediar la señalización de Wnt, como por ejemplo, la proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad 5/6 (LRP5/6) la cual es necesaria para mediar la señal canónica de Wnt <sup>201</sup>. La unión de Wnt (o agonistas presentes en el medio extracelular) con el complejo receptor, desencadena una señal que concluirá en la traducción de la fosfoproteína citoplasmática *Disheveled* (DSH/DVL) la cual a su vez, interactúa directamente con los receptores FZ <sup>202</sup>. En este nivel de la vía de señalización, la señal puede ser ramificada en al menos dos vías: la vía canónica o dependiente de  $\beta$ -catenina, y la vía no canónica o independiente de  $\beta$ -catenina la cual se puede dividir a su vez en la vía de polaridad celular plana o la vía de Wnt/Ca<sup>2+</sup> <sup>203</sup>.

La vía canónica de Wnt regula la acumulación y translocación de la  $\beta$ -catenina al núcleo celular. Frente a una ausencia de señalización de Wnt, la  $\beta$ -catenina es degradada por el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina que está conformado por las proteínas de plegamiento Axina y APC (del inglés “*Adenomatosis Polyposis Coli*”), por la proteína fosfatasa 2A (PP2A), y por las quinasas GSK3b y la cisteína quinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ). La  $\beta$ -catenina es fosforilada dentro del complejo de destrucción a través de la CK1 $\alpha$  y la GSK3b, donde el agregado del grupo fosfato la marca para ser blanco de ubiquitinación y posterior degradación proteolítica por el proteosoma <sup>201,204</sup>. Por el contrario, cuando Wnt se une al complejo receptor formado por FZ y LRP5/6, se desencadenan una serie de eventos que concluyen por desagregar al complejo APC/Axina/GSK3b, impidiendo la degradación de la  $\beta$ -catenina <sup>204</sup>. La unión de Wnt al complejo FZ/LRP5/6 induce la translocación de Axina a la membrana, la cual se une a una secuencia conservada de la cola citoplasmática de LRP5/6 la cual fue previamente fosforilada por CK1 $\alpha$  o GSK3b <sup>205</sup>. Cabe mencionar que la estimulación de Wnt también regula la estabilización de Axina, ya que se produce una desfosforilación de Axina y una disminución en los niveles citoplasmáticos de la misma <sup>206</sup>. Las proteínas CK1 $\alpha$  y GSK3b parecen desempeñar papeles opuestos según el nivel en el que actúan en la vía de señalización canónica: a nivel de LRP5/6 evita la degradación de  $\beta$ -catenina, mientras que a nivel de la  $\beta$ -catenina favorece la degradación de la misma. A continuación, ocurre la activación de DSH por un mecanismo que aún no está del todo descrito. Se cree que DSH puede ser activado de forma indirecta por Axina o por fosforilación mediada por varias quinasas <sup>202</sup>. Una vez activa, DSH inhibe la actividad de GSK3b, activándose una cascada de eventos que tienen como fin evitar la degradación de la  $\beta$ -catenina y por consecuencia, su estabilización y acumulación en el citoplasma. La  $\beta$ -catenina se transloca al núcleo donde ejercerá su función de co-activador transcripcional, interactuando con varios factores de transcripción como por ejemplo los de la familia LEF/TCF, que se unirán al promotor de genes diana, regulando su expresión <sup>207,208</sup> (Figura 8).

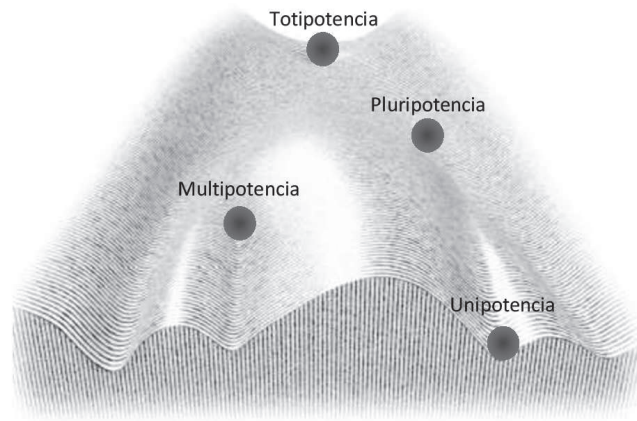


**Figura 8:** Esquema de la inactivación o activación de la vía de señalización canónica de Wnt.

El sistema de señalización de Wnt ha demostrado jugar un papel importante en la regulación de la pluripotencia de las células madre <sup>209–213</sup>. . Se ha visto que los efectos resultantes luego de la activación o inhibición de esta vía están estrictamente ligados al grado/estado de pluripotencia que poseen las células <sup>121,140,151,153,154,193,196,197,209,214–223</sup>.

### 1.7: Epigenética y reprogramación.

Hace más de 60 años, Conrad Waddington publicó su famosa descripción del desarrollo embrionario, en la cual comparó el proceso de diferenciación celular con un escenario de montañas y valles en el que las células indiferenciadas ocupaban los picos de las montañas y durante el proceso de diferenciación, descendían como una pelota hacia los valles donde terminaban reposando como células diferenciadas <sup>224</sup> (Figura 9).



**Figura 9:** Ilustración de la topografía de Waddington.

Durante mucho tiempo se ha postulado que un embrión en estadios tempranos del desarrollo está compuesto por células con la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares que componen a un organismo, y que a medida que avanza el desarrollo irán comprometiéndose a un linaje, perdiendo gradualmente su potencialidad. Sin embargo, con el primer reporte de TNCS y luego con la derivación de las células madre pluripotentes inducidas, se demostró que una célula totalmente diferenciada podía ser “des-diferenciada” o “reprogramada” y originar una población celular capaz de diferenciarse a múltiples tejidos. De esta forma, quedó en evidencia que era necesario reformular el modelo de Waddington, desestimando que la diferenciación celular era un proceso unidireccional e irreversible, y que podía ser ejemplificada como una pelota moviéndose bidireccionalmente, yendo hacia arriba y hacia abajo en la colina.

Durante el proceso de reprogramación se debe producir una eliminación de las marcas epigenéticas presentes en la célula original y se debe establecer una nueva configuración epigenética que sea compatible con el estado pluripotente. Sin embargo, esta reprogramación llevada a cabo por el oocito (durante la TNCS) y/o factores exógenos (durante la obtención de CMPI) suele ocurrir de manera incompleta, dejando una “memoria epigenética” residual en donde genes esenciales para el desarrollo o de pluripotencia no logran ser activados correctamente, o genes específicos de la célula reprogramada no logran ser silenciados, afectando de esta forma la eficiencia de reprogramación, la expresión génica y el fenotipo celular <sup>225-227</sup>. Si bien aún queda mucho por conocer acerca de las barreras epigenéticas que existen a la hora de reprogramar a una célula, algunas de éstas han sido identificadas y modificadas en embriones de varias especies producidos por TNCS.

Uno de los primeros eventos en donde ocurre el arresto del desarrollo en embriones producidos por TNCS es al momento de la activación del genoma embrionario. En un novedoso estudio realizado en la especie murina en el cual compararon el perfil transcripcional y epigenético de embriones producidos por TNCS o FIV con el de las células utilizadas como donantes nucleares, se observó que en el momento de la activación del genoma embrionario (estadio de embrión de 2 células), un gran número de genes no lograban ser activados en los embriones producidos por TNCS, y que estos mismos genes se encontraban inactivos en las células donantes <sup>228</sup>. La particularidad que presentaron dichos genes es que estaban enriquecidos en la marca H3K9me3 tanto en las células donantes como en los embriones producidos por TNCS, demostrando que la presencia de esta marca represiva en los embriones producidos por TNCS era producto de una memoria epigenética y constituía una barrera a la hora de la reprogramación nuclear. Durante este trabajo, los autores observaron que mediante la eliminación transitoria en las células donantes de las metiltransferasas encargadas de depositar los grupos metilos en la H3K9, o mediante la expresión ectópica de la demetilasa responsable de remover esta marca en embriones producidos por TNCS, las regiones resistentes a la reprogramación podían ser reactivadas, y la eficiencia de clonación aumentaba significativamente <sup>228</sup>. La presencia de regiones resistentes a la reprogramación ricas en H3K9me3 pareciera estar conservada en otras especies de mamíferos como humanos <sup>229</sup>, primates <sup>230</sup>, porcinos <sup>231</sup>, ovinos <sup>232</sup> y bovinos <sup>75,233</sup>.

Similarmente, se ha observado que la marca H3K4me3 la cual suele estar presente en las células donantes activando genes somáticos específicos, exhibe niveles elevados en estadios tempranos del desarrollo (estadio de 4 y 8 células) en embriones murinos, bovinos y porcinos producidos por TNCS, sugiriendo que esta marca también estaría vinculada con la memoria epigenética. De hecho en estas especies, la modulación de la expresión de las demetilasas/metiltransferasas específicas de la H3K4me3 ha mostrado ser necesaria para que los embriones producidos por TNCS logren avanzar eficientemente más allá del estadio de 4-8 células <sup>234-236</sup>.

En concordancia, la deposición aberrante de la marca H3K27me3 también ha demostrado afectar el desarrollo pre-implantatorio en clones bovinos, porcinos y murinos, y post-implantatorio en clones murinos. En porcinos, la disminución de los niveles de H3K27me3 resultó esencial para que un mayor número de clones pueda alcanzar el estadio de blastocisto <sup>237</sup>. En bovinos, se demostró que embriones producidos por TNCS en el estadio de 2 a 8 células poseían niveles elevados de la H3K27me3, y que mediante la expresión ectópica de la demetilasa específica de

esta marca, se activaban genes ligados al cromosoma X y al metabolismo y adhesión celular, aumentando significativamente la eficiencia de la técnica <sup>238</sup>. En cuanto a la especie murina, en un estudio en el cual compararon el transcriptoma de blastocistos murinos de ambos sexos producidos por TNCS o FIV, descubrieron que muchos genes ligados al cromosoma X se encontraban inactivados en los embriones producidos por TNCS, independientemente del sexo del embrión <sup>239</sup>. Esta observación estableció un vínculo entre la técnica de TNCS y el proceso de inactivación del cromosoma X. Este proceso está dirigido por el ARN no codificante *Xist* que recluta al complejo represivo Polycomb-2 (PRC2) que deposita la marca de histona represiva H3K27me3 <sup>240</sup>, lo que lleva a la heterocromatinización, y por lo tanto inactivación de todo el cromosoma X <sup>241</sup>. Similarmente, reportes en los cuales estudiaron el perfil epigenético y transcriptómico de blastocistos o tejido placentario derivado de embriones producidos por TNCS, identificaron genes involucrados con el desarrollo placentario que, en lugar de ser expresados únicamente por el alelo paterno, eran expresados por ambos alelos parentales (al igual que en las células donantes), indicando una falla en el *imprinting* y/o silenciamiento dependiente de H3K27me3 para estos genes <sup>242,243</sup>.

Es necesario destacar que las barreras epigenéticas aquí mencionadas son sólo algunas de las muchas que pueden llegar a presentarse durante la reprogramación nuclear dado que existe evidencia que asocia la memoria epigenética con otras modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN, otras modificaciones de histonas, alteraciones en las variantes de histonas y ARN no codificantes <sup>104,244</sup>. Sin embargo, estos antecedentes demuestran que la TNCS representa un excelente modelo para entender los mecanismos epigenéticos, de diferenciación y de reprogramación celular, ratificando que una correcta reprogramación epigenética es crucial para asegurar un correcto desarrollo embrionario <sup>244</sup>.

### **1.8: Células madre embrionarias bovinas como modelo de estudio: limitaciones y potenciales aplicaciones.**

Mas allá del uso de la TNCS como técnica reproductiva o en programas de conservación de individuos dentro de una especie, esta técnica constituye una valiosa herramienta para estudiar los mecanismos involucrados en la reprogramación celular. Si bien por lo general los problemas en la reprogramación en embriones producidos por TNCS suelen asociarse con alteraciones en el

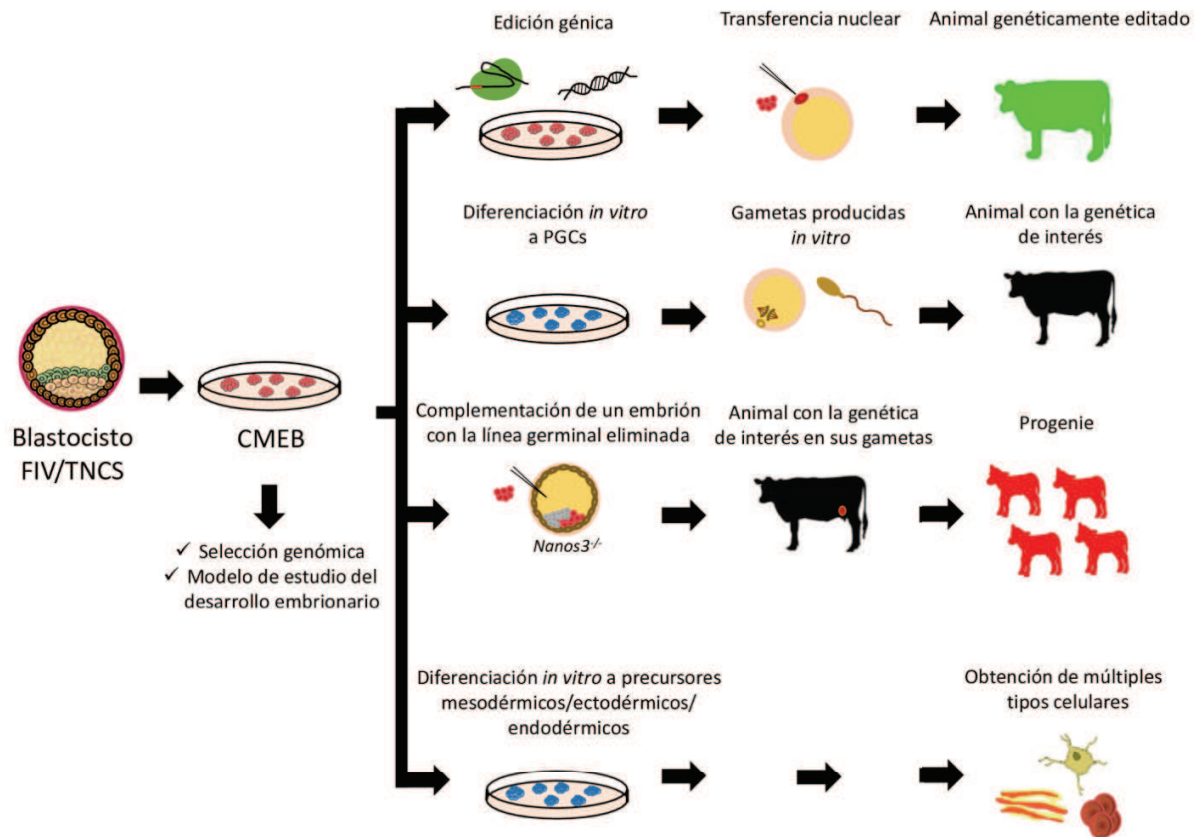


desarrollo de tejidos extraembrionarios <sup>245-249</sup>, poco se sabe acerca de las otras poblaciones celulares que componen el blastocisto, como por ejemplo el MCI. Sin embargo, el bajo número de células que componen el MCI, sumado a la dificultad en aislar esta población de manera eficiente, refleja la necesidad de encontrar un nuevo modelo para poder estudiar esta población celular. Las células madre embrionarias constituyen un excelente modelo para poder estudiar los fenómenos que ocurren durante la determinación del MCI ya que pueden ser derivadas *in vitro* y poseen una ilimitada capacidad proliferativa. No obstante, la obtención de células madre embrionarias bovinas posee ciertas limitaciones. Las condiciones descritas para su obtención las cuales involucran el uso del medio CTFR y de iMEF como capa nutricia, son complejas, indefinidas y poco reproducibles, lo que limita la obtención de estas células por parte de otros grupos de investigación. El medio CTFR no se encuentra disponible comercialmente, sino que es preparado por una instalación de la Universidad de Salk (USA). Consiste en una mezcla meticulosa de más de 50 reactivos validados para el cultivo de células madre <sup>250,251</sup>, siendo su preparación un proceso complejo y costoso, el cual requiere de mucho tiempo y mano de obra, lo que resulta en un medio poco práctico e inaccesible para ser utilizado. Por otro lado, el uso de iMEF también contribuye a disminuir la reproducibilidad del cultivo. Los iMEF segregan factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión y componentes de matriz extracelular que, en conjunto, logran mantener la viabilidad, la tasa de proliferación y el estado indiferenciado de las células madre pluripotentes <sup>252</sup>. Sin embargo, trabajar con más de un tipo celular y no conocer con exactitud los factores secretados y cómo éstos interactúan entre sí, representa una limitación a la hora de aplicar esta tecnología y de estudiar las vías de señalización involucradas en el mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación celular. Por esta razón, se han probado numerosas matrices, biomoléculas sintéticas o proteínas recombinantes para reemplazar el uso de los iMEF en el cultivo de las células madre pluripotentes, incluyendo Laminina, Fibronectina, Colágeno, Vitronectina, Matrigel, entre otros. Por lo aquí descrito, queda en evidencia la necesidad de encontrar alternativas simples, reproducibles, accesibles y definidas que logren reemplazar el uso del medio CTFR y de los iMEF como capa nutricia, y que sean adecuadas para establecer y mantener de forma estable a las CMEB. Obtener CMEB de forma simple y estable constituirá una valiosa herramienta en el área de biología básica y aplicada ya que podrían ser utilizadas como modelo de estudio del desarrollo, pluripotencia y diferenciación celular. Además, debido a que las células madre pluripotentes poseen una alta tasa proliferativa y son consideradas inmortales, éstas podrían ser utilizadas para

realizar múltiples o complejas ediciones genéticas, permitiendo mejorar rasgos asociados a la producción, crear modelos animales de enfermedades humanas o crear bio-reactores animales que produzcan proteínas de interés farmacológico y/o alimenticio <sup>253,254</sup>. Además, las células podrían ser editadas genéticamente y luego empleadas como donantes nucleares durante la técnica de clonación y de esta forma, se podría obtener un animal con múltiples ediciones en una sola generación (Figura 10).

Por otro lado, debido a que las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tejidos embrionarios (y extraembrionarios si se considera a las células madre pluripotentes de potencial expandido), éstas podrían ser utilizadas para producir múltiples tipos celulares a partir de una población homogénea y completamente caracterizada. Esta capacidad pluripotente posiciona a las células madre como una valiosa herramienta en distintas áreas como la agricultura celular, pudiendo diferenciarlas a tejido muscular y adiposo y de esta forma producir carne *in vitro* <sup>255</sup>; o en el área de las biotecnologías reproductivas pudiendo generar gametas funcionales *in vitro* (lo cual ya ha sido reportado previamente en ratón <sup>167,256</sup>) (Figura 10). De hecho, en un esquema teórico denominado cría de precisión (del inglés “*in vitro breeding*”) se ha postulado que el uso combinado de selección genómica sobre las células madre embrionarias en conjunto con la producción *in vitro* de gametas, podría disminuir significativamente el intervalo generacional y acelerar el progreso genético de una población <sup>257</sup>.

Asimismo, la tecnología de células madre pluripotentes podría ser utilizada para sustituir órganos intra- o inter-especie y para crear padres sustitutos <sup>258</sup> (siempre y cuando se compruebe la capacidad de las líneas celulares de contribuir a la línea germinal de quimeras). De esta forma, se pueden complementar blastocistos de animales que posean eliminada la línea germinal con células madre pluripotentes de un animal con una genética de interés <sup>259</sup> (Figura 10).



**Figura 10:** Potenciales aplicaciones de las células madre embrionarias bovinas.

Todas estas atractivas aplicaciones pueden ser extrapoladas a células madre pluripotentes inducidas y células madre embrionarias, donde a su vez, estas últimas pueden ser derivadas a partir de distintas fuentes embrionarias, como por ejemplo, a partir de embriones generados por activación partenogenética (los cuales son producidos mediante la activación artificial de un oocito sin la presencia del gameto masculino) o por TNCS. La obtención de células madre embrionarias derivadas de embriones producidos por activación partenogenética resultará en la obtención de células inmuno-compatibles con el donante oocitario, y permitirá estudiar en profundidad la contribución del alelo materno y el *imprinting* génico, evaluando su efecto sobre la diferenciación celular y el desarrollo. Por otra parte, la obtención de células madre embrionarias a partir de embriones producidos por TNCS resultará en la obtención de células inmuno-compatibles con el donante nuclear, y permitirá expandir una genética de interés mediante la obtención de una fuente ilimitada de células pluripotentes a partir de organismos adultos, infértiles, fuera del ciclo reproductivo, e incluso muertos, sin la necesidad de recurrir a tecnologías de edición génica, como

es el caso de las células madre pluripotentes inducidas. Finalmente, éstas servirán para estudiar los mecanismos involucrados en la reprogramación celular, evaluando si los mismos ocurrieron correctamente o si las células exhiben alteraciones moleculares que podrían ser responsables de los defectos observados en los clones. De esta forma, identificar barreras que impiden la reprogramación permitirá diseñar estrategias con el fin de aumentar la eficiencia de la TNCS y obtener embriones de mejor calidad.

## ○ **Hipótesis y Objetivos**

## 2.1 Hipótesis.

Los embriones producidos por TNCS presentan alteraciones en el epigenoma y transcriptoma debido a la incorrecta reprogramación del núcleo de la célula donante. Numerosos trabajos han demostrado que la incorrecta reprogramación es producto de la memoria epigenética en la célula donante lo cual afecta el desarrollo embrionario en estadios pre- y post-implantatorios, alterando principalmente el fenotipo de las células del TE. Sin embargo, poco se conoce acerca de las características moleculares que poseen las células del MCI. Debido a la complejidad que involucra aislar el MCI de un blastocisto sin contaminación de las otras poblaciones celulares presentes en esta estructura embrionaria, y a la escasa cantidad de células que pueden obtenerse, durante este trabajo proponemos emplear a las células madre embrionarias bovinas como modelo *in vitro* para estudiar los eventos de reprogramación que ocurren en el MCI de embriones bovinos producidos por TNCS.

**De esta forma, planteamos como hipótesis del presente trabajo que las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por transferencia nuclear de células somáticas presentan diferencias en su epigenoma y transcriptoma en comparación a las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por fecundación *in vitro*, debido a una incorrecta reprogramación del macizo celular interno durante la técnica de clonación.**

## 2.2 Objetivo general.

Estudiar y comparar el epigenoma y transcriptoma de las CMEB obtenidas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS.

## 2.3 Objetivos particulares.

2.3.1. Establecer un método simple y reproducible de derivación de CMEB a partir de embriones producidos *in vitro*, que involucre el uso de medios de cultivo y matrices químicamente definidas, y que sea capaz de mantener el estado pluripotente de las células *in vitro*.

2.3.2. Producir embriones mediante la técnica de TNCS y activación partenogenética para derivar líneas de CMEB en las condiciones establecidas en 2.3.1.

2.3.3. Caracterizar las líneas obtenidas a partir de las distintas fuentes embrionarias mediante el análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia, fosfatasa alcalina y cariotipo.

2.3.4. Determinar en las líneas obtenidas a partir de distintas fuentes embrionarias la distribución global de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3, identificando regiones genómicas que posean distinta señal de las marcas de histonas analizadas.

2.3.5. Analizar el transcriptoma de las líneas obtenidas a partir de distintas fuentes embrionarias para determinar su perfil global de expresión y detectar genes diferencialmente expresados.

2.3.6. Estudiar la correlación entre los genes diferencialmente expresados y las regiones con distinta señal de las marcas de histonas analizadas.

2.3.7. Analizar las características de la cromatina, específicamente en regiones promotoras, de las líneas obtenidas por distintas fuentes embrionarias.

○ **Capítulo 1: Optimización del método de derivación y cultivo de las células madre embrionarias bovinas**



### **3: Capítulo 1: Resultados.**

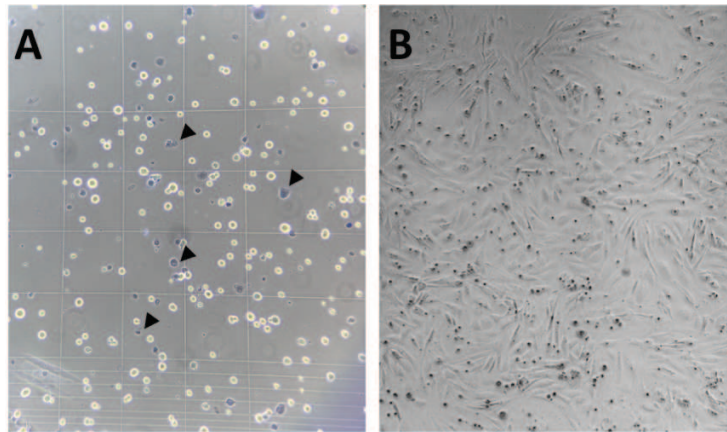
Las primeras CMEB en ser derivadas que mostraron verdadera pluripotencia y estabilidad fenotípica, fueron obtenidas utilizando condiciones de cultivo que involucraban el uso del medio CTFR en presencia de iMEF. Sin embargo, estas condiciones resultaron poco reproducibles limitando la aplicación y estudio de las CMEB. Por lo tanto, en este capítulo nuestro objetivo consistió en simplificar las condiciones de cultivo de las CMEB, buscando alternativas comerciales al medio CTFR, y reemplazando a los iMEF por matrices libres de células. Como alternativa al medio CTFR, probamos los medios comerciales mTeSR Plus, el medio E6 y el medio N2B27, en donde este último consiste en la mezcla de aproximadamente 10 reactivos comerciales. En cuanto a las matrices libres de células, evaluamos el uso de Vitronectina y Matrigel.

En primera instancia, cultivamos a las CMEB previamente derivadas en condiciones CTFR en presencia de los nuevos medios de cultivo y matrices, y definimos aquellas condiciones capaces de reemplazar al medio CTFR y a los iMEF. Una vez definidas, el siguiente paso consistió en utilizar estas condiciones para derivar nuevas líneas de CMEB a partir de embriones producidos por FIV. Las líneas derivadas fueron validadas para corroborar su pluripotencia y estabilidad a lo largo del tiempo mediante el análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia y antígenos de superficie, la actividad de la fosfatasa alcalina, el análisis del cariotipo y del ciclo celular, y capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, demostramos que las nuevas condiciones simplificadas de cultivo podían ser utilizadas para estudiar las vías de señalización involucradas en el mantenimiento del programa de pluripotencia bovino.

#### **3.1: Viabilidad de los fibroblastos embrionarios murinos irradiados.**

Los iMEF son ampliamente utilizados durante el cultivo de células madre pluripotentes de múltiples especies. Luego de ser sometidos a irradiación gamma, estas células se mantienen metabólicamente activas pero mitóticamente inactivas, sirviendo como capa nutricia y soporte físico a las células madre<sup>252</sup>. Durante este trabajo, se utilizaron fibroblastos embrionarios murinos derivados de fetos de 12-14 días de gestación y se los cultivó *in vitro* hasta el tercer pasaje (P3), momento en el cual fueron irradiados. La irradiación gamma produce daños en el ADN mediante rupturas de doble cadena lo cual suprime la división celular. Es por ello que luego de la irradiación es necesario comprobar la viabilidad celular, la cual debe ser de al menos un 80% para poder

utilizar las células. La viabilidad celular fue estimada mediante una tinción con *Trypan Blue*, un colorante azul que difunde a través de las membranas celulares que se encuentran desestabilizadas o rotas (señal de muerte celular) y por lo tanto las células se tiñen de color azul. Luego de la irradiación, el 87% de las células se encontraban viables con una morfología conservada, y por lo tanto fue posible emplearlas en los sucesivos experimentos (Figura 11).



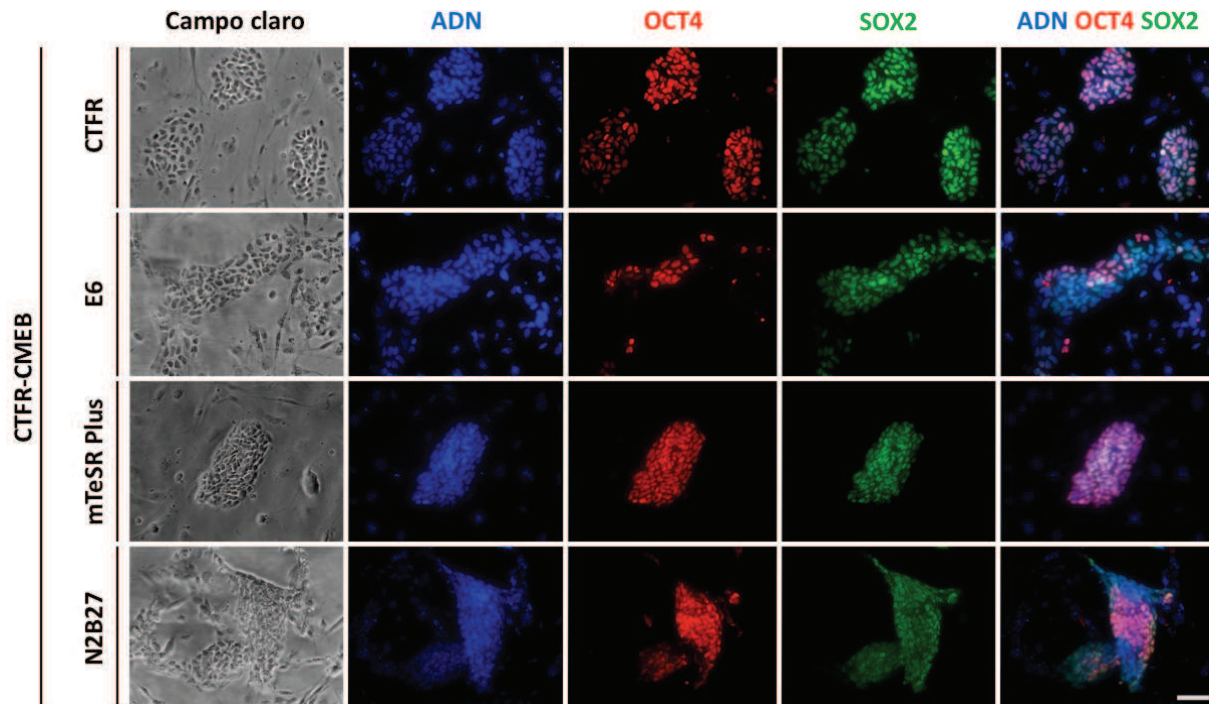
**Figura 11:** Viabilidad de los fibroblastos embrionarios murinos irradiados. **A.** Ensayo de *Trypan Blue* para cuantificar la viabilidad celular. Las flechas muestran ejemplos de células muertas las cuales se evidencian por su coloración azul. **B.** Fotomicrografía en campo claro de los iMEF luego de ser cultivados por 24h.

### **3.2: Sustitución del medio CTFR por los medios E6, N2B27 y mTeSR Plus. Efecto de la suplementación con KSR o BSA.**

El primer paso para optimizar las condiciones de cultivo de las células madre embrionarias bovinas consistió en sustituir el medio basal CTFR por alternativas más simples, definidas y comercialmente disponibles. Con este fin, se utilizaron dos líneas derivadas y mantenidas en condiciones CTFR (CTFR-CMEB) las cuales fueron cultivadas durante 4-6 pasajes utilizando los medios basales E6<sup>250</sup> (del inglés “*Essential 6*”), N2B27<sup>260,140</sup> y mTeSR Plus<sup>261</sup>. Estos medios fueron seleccionados en base a su capacidad de mantener el estado indiferenciado de las células madre pluripotentes de otras especies, y a que poseen como componente principal el medio DMEM/F12, al igual que el medio CTFR. En todos los casos, los medios alternativos fueron suplementados con 2,5  $\mu$ M de IWR1, y en caso de que el medio no contuviese FGF2, se lo suplementó con 20 ng/mL este factor de crecimiento.

Para validar la capacidad de los medios alternativos de reemplazar al medio CTFR, se evaluó la morfología de las colonias, la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia, y se evaluó de manera cualitativa la tasa de crecimiento.

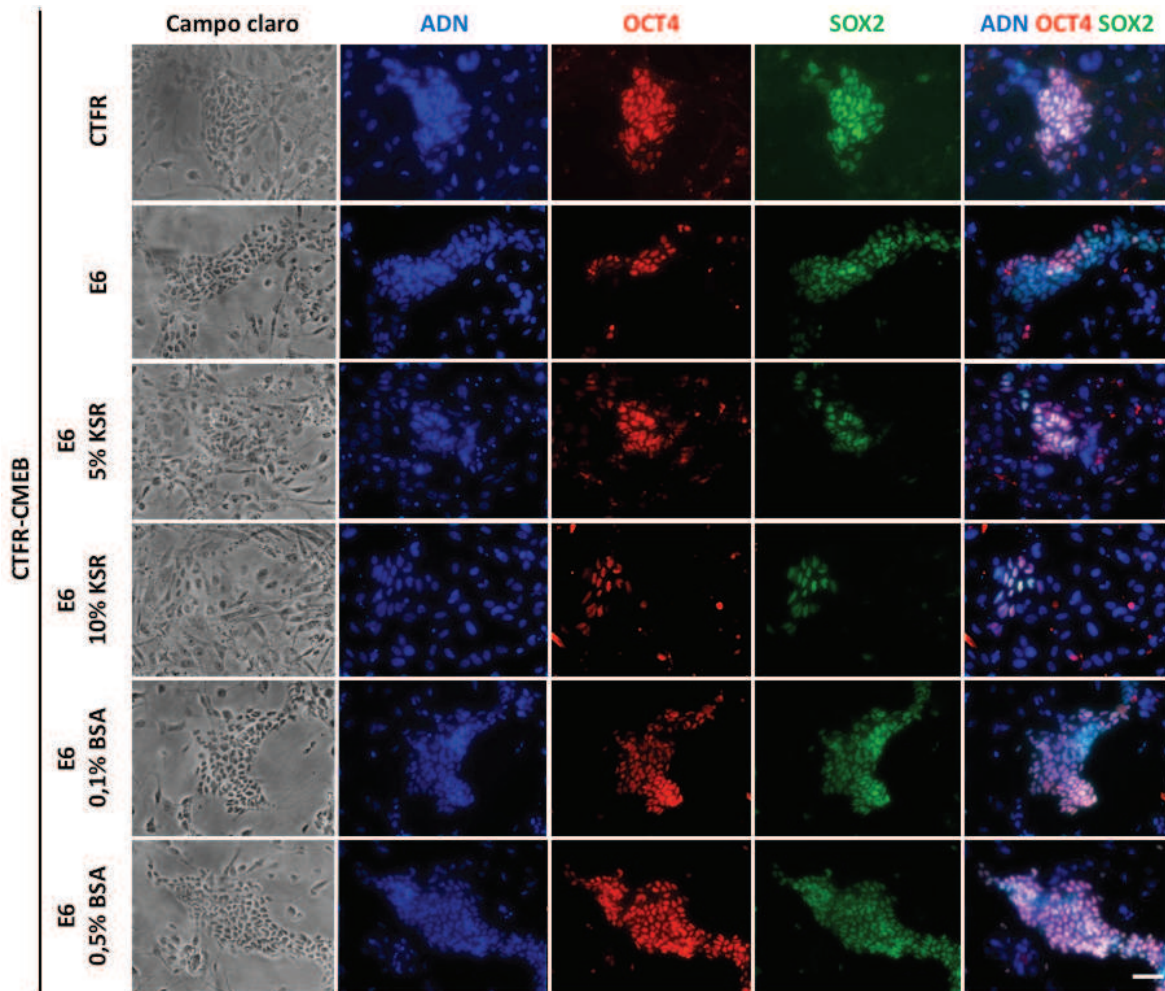
Al igual que en el reporte original <sup>193</sup>, las líneas de CMEB cultivadas en el medio CTFR presentaron una morfología de crecimiento en colonias planas con bordes irregulares, poseían expresión homogénea de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2, y pudieron ser amplificadas cada 3-4 días en una relación 1:10. Similarmente, cuando las líneas CTFR-CMEB fueron cultivadas en el medio mTeSR Plus, éstas exhibieron una morfología más compacta y definida, y mantuvieron una proliferación activa junto con una expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 (Figura 12), indicando que el medio mTeSR Plus podía mantener el fenotipo de las CTFR-CMEB. Sin embargo, cuando el medio CTFR fue reemplazado por los medios E6 o N2B27, las células perdieron sus características pluripotentes. En presencia del medio E6, las células enlentecieron su crecimiento y perdieron, casi en su totalidad, la expresión del marcador de pluripotencia OCT4; mientras que cuando las células fueron cultivadas en el medio N2B27, éstas lograron conservar su capacidad de auto-renovación pero la expresión del marcador de pluripotencia OCT4 resultó heterogénea (Figura 12).



**Figura 12:** Cultivo de las líneas CTFR-CMEB en los medios comerciales E6, N2B27 y mTeSR Plus. Detección de la expresión de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas CTFR-CMEB adaptadas al medio E6, mTeSR Plus o N2B27. Dos líneas CTFR-CMEB independientes fueron evaluadas en los diferentes medios de cultivo. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

Dado que el medio CFTR y el medio mTeSR Plus poseen aproximadamente un 1,3% de BSA en su formulación<sup>251</sup>, continuamos por estudiar si suplementar los medios E6 y N2B27 con distintas concentraciones de BSA u otro soporte proteico como el *knock out serum replacement* (KSR) tendría un efecto positivo sobre la proliferación celular y la expresión de marcadores de pluripotencia de las células. Las concentraciones de KSR y BSA fueron elegidas en base a las concentraciones habitualmente utilizadas para mantener células madre pluripotentes de otras especies.

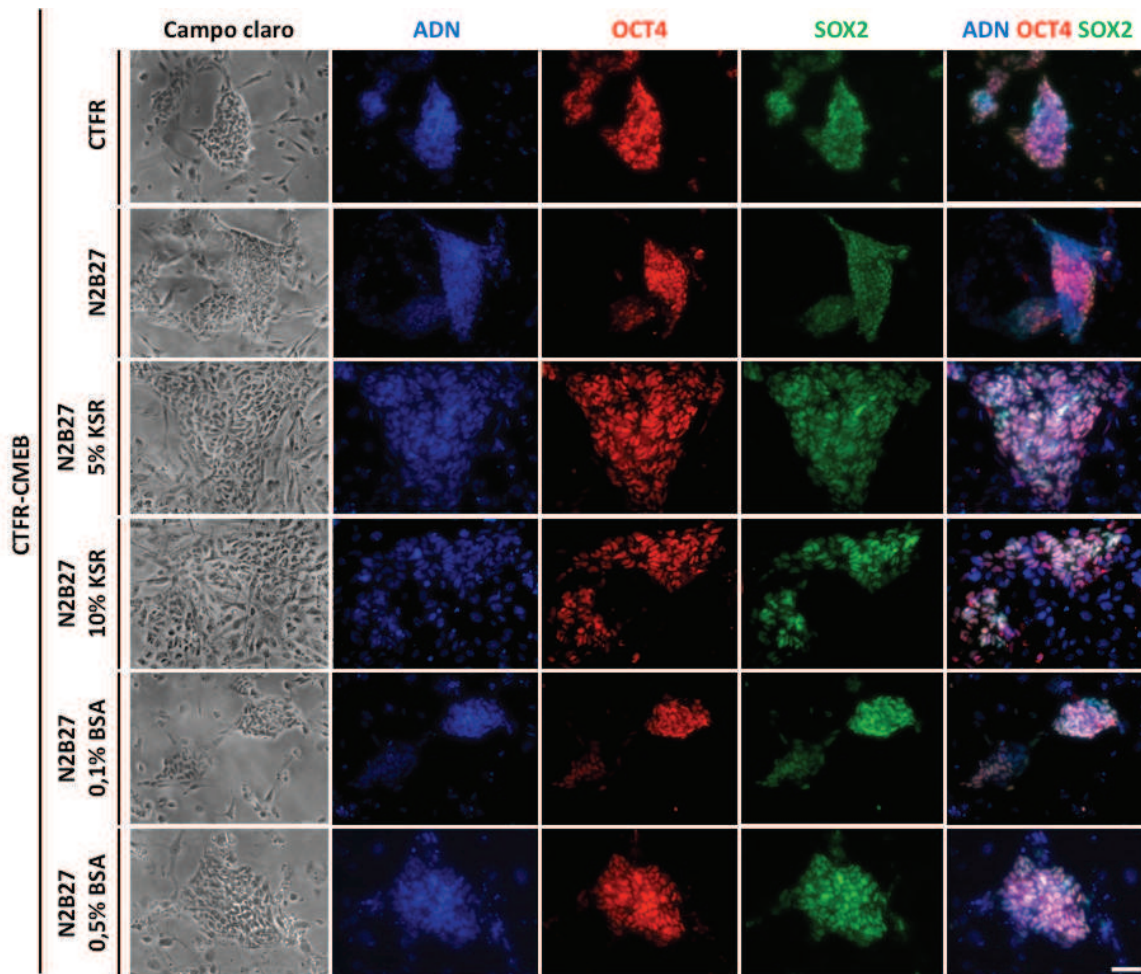
Al suplementar al medio E6 con 5% o 10% de KSR, las células perdieron su morfología, enlentecieron su crecimiento y mostraron una expresión heterogénea de los marcadores de pluripotencia. Por otro lado, cuando el medio E6 fue suplementado con 0,1% o 0,5% de BSA, las células conservaron la morfología de las colonias, observándose colonias con bordes definidos, aunque la tasa de crecimiento continuó siendo lenta y la expresión de OCT4 fue heterogénea (Figura 13).



**Figura 13:** Cultivo de las líneas CTFR-CMEB en el medio E6 suplementado con KSR o BSA. Detección de la expresión de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas CTFR-CMEB cultivadas en el medio E6 suplementado con KSR (5% o 10%) o BSA (0,1% o 0.5%). Dos líneas CTFR-CMEB independientes fueron evaluadas utilizando el medio E6 con distintos suplementos proteicos. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

En el caso del medio N2B27, cuando éste fue suplementado con 5% o 10% de KSR las células mantuvieron su capacidad de auto-renovación con una expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia, aunque las colonias perdieron su morfología dado que no se observó crecimiento en colonias compactas lo cual dificultaba distinguirlos de los iMEF. Finalmente, cuando evaluamos suplementar el medio N2B27 con 0,1% o 0,5% de BSA, las células conservaron su tasa de proliferación y morfología, creciendo en colonias compactas con bordes definidos (Figura 14). Pudimos observar que a mayor concentración de BSA (0,5%) la expresión del marcador OCT4

resultó más homogénea y las colonias poseían un mayor tamaño. En base a estos resultados, y considerando que mayores concentraciones de BSA mejoraron el fenotipo de las colonias, en futuros experimentos decidimos incrementar la concentración de BSA a valores similares a los descriptos para la formulación del medio CTFR.

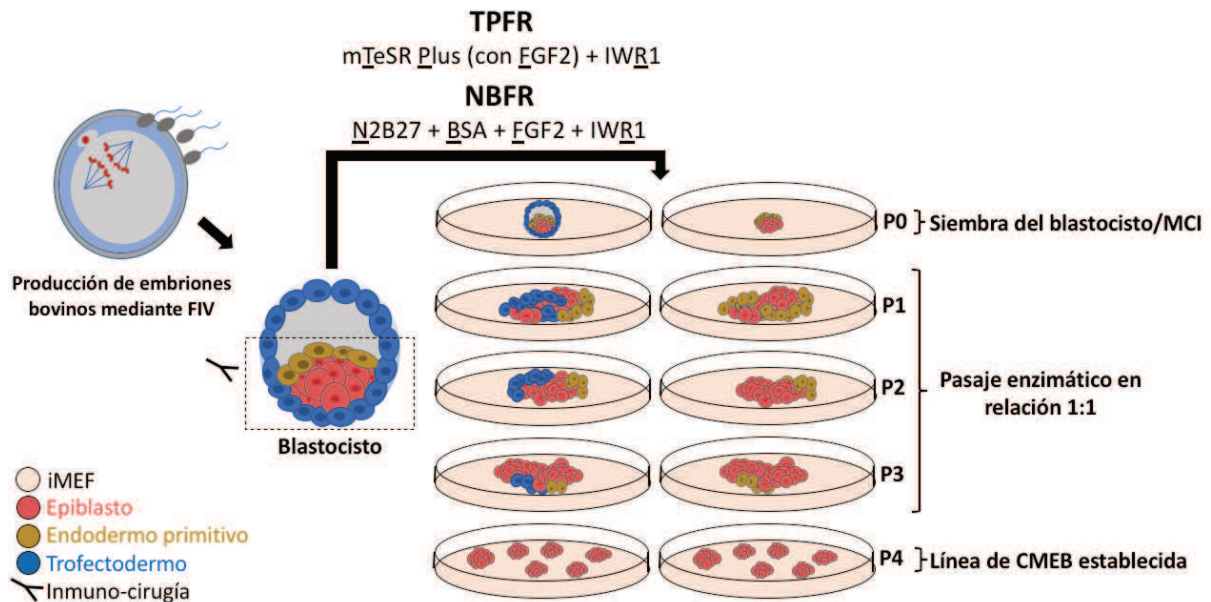


**Figura 14:** Cultivo de las CTFR-CMEB en el medio N2B27 suplementado con KSR o BSA. Detección de la expresión de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas CTFR-CMEB cultivadas en el medio N2B27 suplementado con KSR (5% o 10%) o BSA (0,1% o 0.5%). Dos líneas CTFR-CMEB independientes fueron evaluadas utilizando el medio N2B27 con distintos suplementos proteicos. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

En conclusión, demostramos que los 6 componentes que conforman al medio E6 no son suficientes para mantener la auto-renovación y expresión de marcadores de pluripotencia de las líneas CTFR-CMEB, aún en presencia de KSR o BSA. Comprobamos que el mantenimiento del fenotipo de las CMEB requiere de medios basales más enriquecidos como el medio mTeSR Plus y el medio N2B27 suplementado con BSA. De esta forma, pudimos simplificar el cultivo de las células madre embrionarias bovinas, logrando reemplazar las condiciones CTFR por las nuevas condiciones de cultivo que denominamos NBFR (medio N2B27, 1% de BSA, 20 ng/mL de FGF2 y 2,5  $\mu$ M de IWR) o TPFR (medio mTeSR Plus que contiene FGF2, y 2,5  $\mu$ M de IWR) las cuales lograron mantener la morfología, capacidad proliferativa y expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia de las líneas de CMEB.

### **3.3: Derivación y cultivo de células madre embrionarias bovinas en condiciones NBFR y TPFR.**

Habiendo comprobado que los medios mTeSR Plus y N2B27 suplementado con BSA eran capaces de mantener el fenotipo de las líneas CTFR-CMEB, el siguiente paso fue comprobar si estas condiciones de cultivo podrían ser utilizadas para derivar nuevas líneas de células madre embrionarias bovinas. Con este fin, se produjeron embriones mediante la técnica de FIV utilizando oocitos provenientes de animales de faena y semen de toros de raza *Holstein*. Los embriones obtenidos fueron utilizados para derivar nuevas líneas a partir de: MCI aislados por inmunocirugía, blastocistos individuales, o grupos de 3 a 4 blastocistos. Los blastocistos/MCI fueron sembrados sobre una monocapa de iMEF y cultivados en condiciones NBFR o TPFR hasta el pasaje 3 o 4, momento en el cual se evaluó la aparición de colonias y se consideró que la línea había sido establecida (Figura 15).



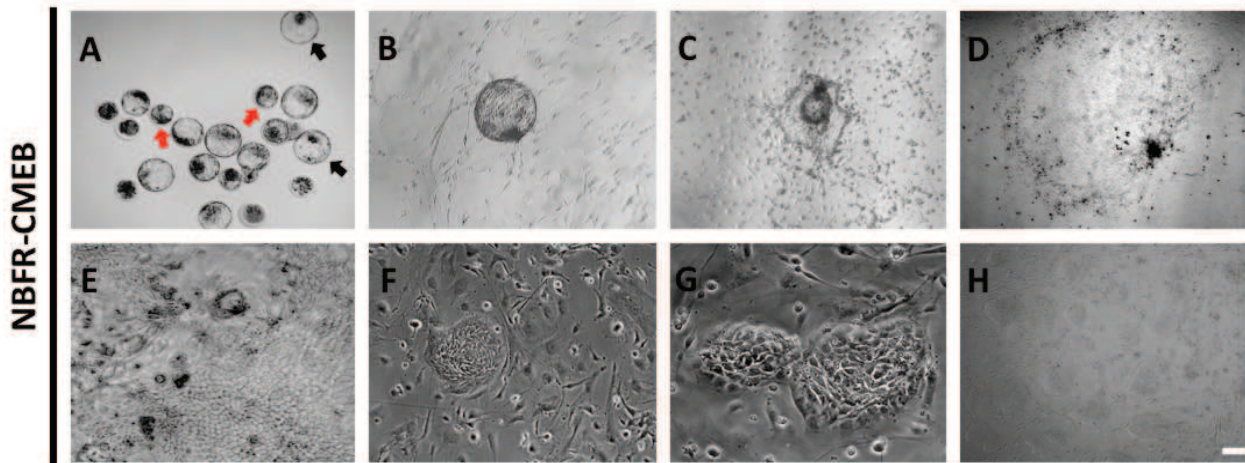
**Figura 15:** Esquema de derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas a partir de blastocistos individuales o MCI aislados.

Con el fin de estudiar la dinámica del crecimiento celular durante estadios tempranos de la derivación y al momento del establecimiento de la línea celular, observamos la morfología de las células y evaluamos por inmunofluorescencia la presencia de células derivadas del epiblasto ( $OCT4^+$ ,  $SOX2^+$ ,  $CDX2^-$ ,  $GATA6^-$ ), células derivadas del TE ( $OCT4^-$ ,  $SOX2^-$ ,  $CDX2^+$ ,  $GATA6^-$ ), y células derivadas del hipoblasto/endodermo primitivo ( $OCT4^-$ ,  $SOX2^-$ ,  $CDX2^-$ ,  $GATA6^+$ ).

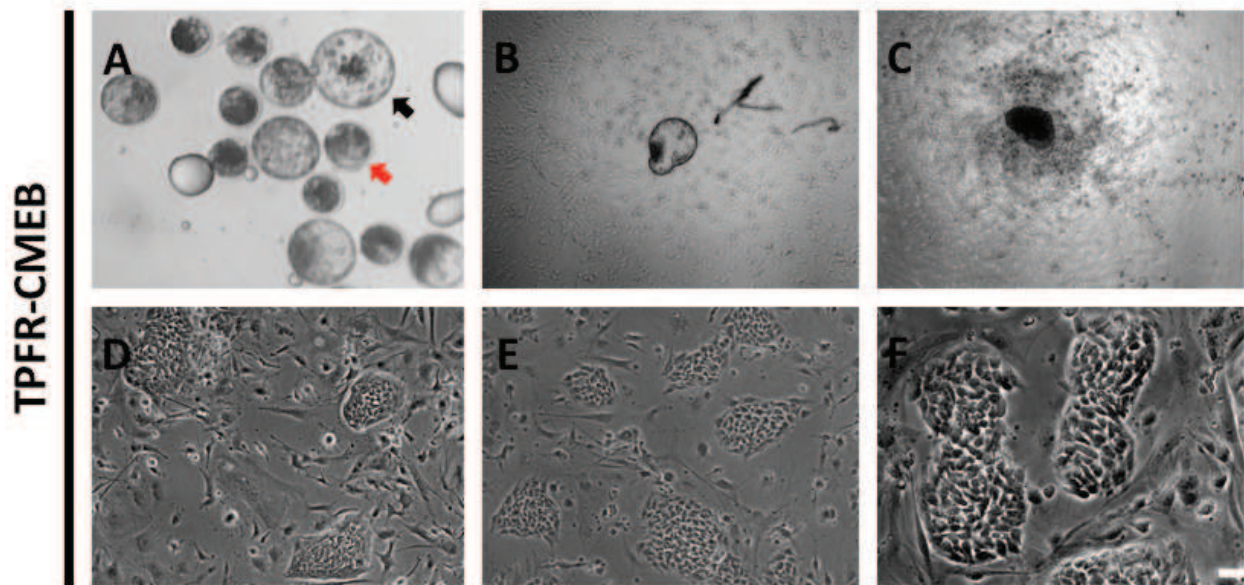
En ambas condiciones de cultivo, observamos que durante el primer estadio de derivación (pasaje cero, P0) se formaba un halo de crecimiento el cual estaba formado por células de morfología variada alrededor del MCI/blastocisto adherido (Figura 16D-E y 17C). Mediante inmunofluorescencia, identificamos que ese halo estaba principalmente formado por células derivadas del TE ( $OCT4^-$ ,  $SOX2^-$ ,  $CDX2^+$ ,  $GATA6^-$ ) y del hipoblasto/endodermo primitivo ( $OCT4^-$ ,  $SOX2^-$ ,  $CDX2^-$ ,  $GATA6^+$ ), mientras que las células derivadas del epiblasto ( $OCT4^+$ ,  $SOX2^+$ ,  $CDX2^-$ ,  $GATA6^-$ ) eran minoritarias, exhibían una morfología redondeada, poseían un pequeño tamaño y presentaban una coloración oscura (Figura 18). Sin embargo, conforme fueron sub-cultivadas, el halo se iba perdiendo gradualmente, y se observaba una mayor cantidad de células características del epiblasto (Figura 16 y 17). Generalmente, entre el pasaje 3 a 5, las células derivadas del epiblasto formaban colonias compactas con bordes irregulares, lo cual era indicativo



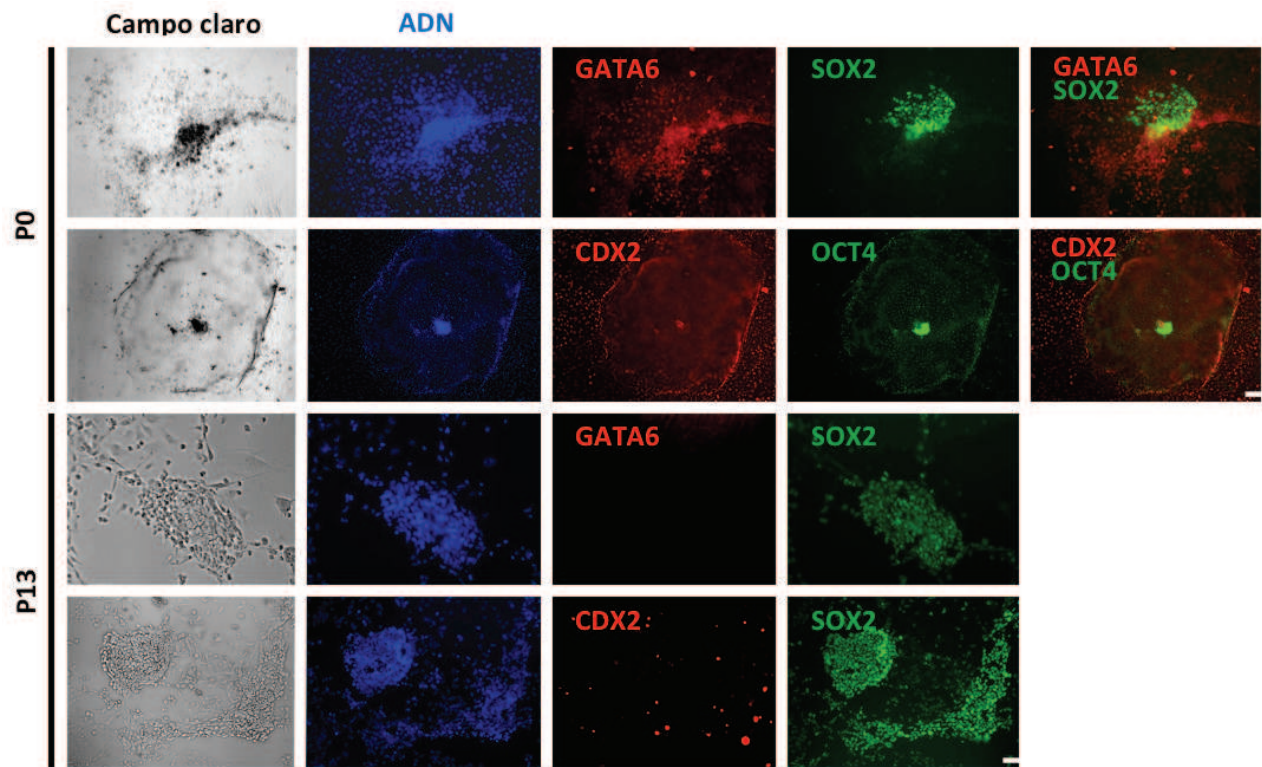
del establecimiento de la línea de CMEB. Una vez establecida la línea, las únicas células detectables en cultivo eran aquellas derivadas del epiblasto (Figura 18).



**Figura 16:** Derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas en condiciones NBFR a partir de blastocistos bovinos producidos por FIV. Fotomicrografías en campo claro del proceso de derivación de CMEB en condiciones NBFR (NBFR-CMEB). **A.** Blastocistos obtenidos a día 7 de cultivo embrionario *in vitro*. Las flechas negras indican blastocistos de buena calidad mientras que las flechas rojas indican blastocistos de mala calidad. **B.** Blastocisto sembrado individualmente sobre los iMEF. **C.** Halo de crecimiento de células derivadas de un blastocisto luego de 3 días de estar adherido a los iMEF. **D.** Halo de crecimiento de células derivadas de un blastocisto luego de 5 días de cultivo sobre iMEF. **E.** Crecimiento de células con distinta morfología luego del primer pasaje. **F.** Establecimiento de la línea de CMEB luego de 3 pasajes evidenciado por la formación de colonias. **G.** Colonias de CMEB luego de 7 pasajes. **H.** Colonias de CMEB luego de 18 pasajes. Escala correspondiente a 100 µm.

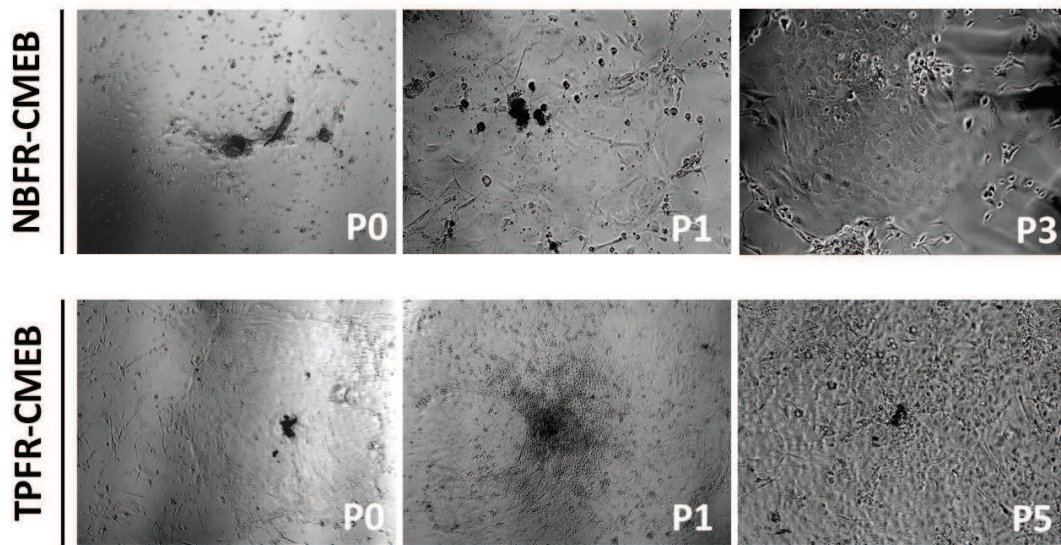


**Figura 17:** Derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas en condiciones TPFR a partir de blastocistos bovinos producidos por FIV. Fotomicrografías en campo claro del proceso de derivación de CMEB en condiciones TPFR (TPFR-CMEB). **A.** Blastocistos obtenidos de día 7 de cultivo embrionario *in vitro*. La flecha negra indica un blastocisto de buena calidad mientras que la flecha roja indica un blastocisto de mala calidad. **B.** Blastocisto en proceso de eclosión sembrado individualmente sobre los iMEF. **C.** Halo de crecimiento de células derivadas de un blastocisto luego de 6 días de cultivo sobre iMEF. **D.** Establecimiento de la línea de CMEB luego de 3 pasajes evidenciado por la formación de colonias. **E.** Colonias de CMEB luego de 8 pasajes. **F.** Colonias de CMEB luego de 15 pasajes. Escala correspondiente a 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18:** Caracterización de marcadores de epiblasto, TE e hipoblasto/endodermo primitivo a distintos tiempos de cultivo. Inmunofluorescencia representativa para una de las líneas NBFR-CMEB en donde se muestra la expresión de marcadores del epiblasto (OCT4 y SOX2), TE (CDX2) e hipoblasto/endodermo primitivo (GATA6) en estadios iniciales de la derivación (pasaje cero, P0) y en líneas ya establecidas (pasaje 13, P13). Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

En el caso de aquellas líneas que no lograron ser establecidas, se observó que a medida que avanzaban los primeros estadios de derivación, las células derivadas del epiblasto formaban un grupo oscuro de células difícil de disgregar, sin observarse proliferación de las mismas. Asimismo, detectamos la presencia de células con una morfología tipo cuboidal, característico de células derivadas del TE, que crecían en forma de monocapa. Pese a ser mantenidas en cultivo por más de 7 pasajes, no se observó la formación de colonias y por lo tanto, consideramos que en estos cultivos no se logró establecer una línea de células madre embrionarias (Figura 19).



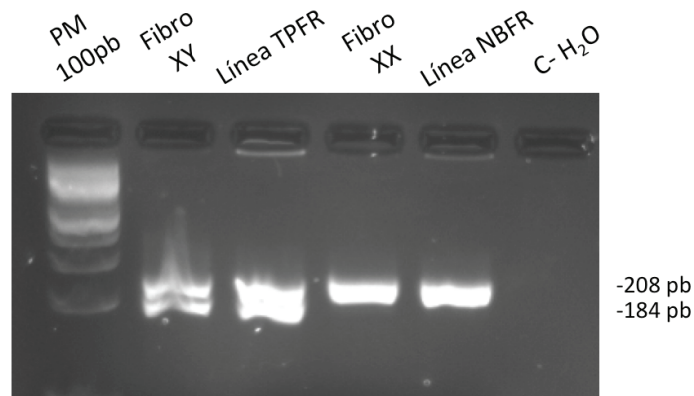
**Figura 19: Líneas que no pudieron ser establecidas.** Fotomicrografías en campo claro que muestran los crecimientos de las células derivadas de blastocistos en distintos pasajes en condiciones NBFR o TPFR. Se observa la presencia de células con morfología de tipo cuboideal y la formación de agrupaciones celulares oscuras provenientes de células del MCI. En todos los casos, no pudo observarse formación de colonias. “Px” corresponde al número de pasaje en que se encontraban las células.

Utilizando las condiciones de cultivo NBFR, se lograron establecer 8 líneas a partir de 28 blastocistos individuales, 1 línea a partir de 2 grupos de 3-4 blastocistos, y 1 línea a partir de 7 MCI aislados y cultivados individualmente. Por otro lado, utilizando las condiciones TPFR se lograron establecer 3 líneas a partir de 10 blastocistos individuales (Tabla II). Con el fin de determinar el sexo de las distintas líneas obtenidas, se detectó al gen *DEAD box helicasa 3 (Ddx3x/Ddx3y)*<sup>262</sup> mediante PCR. La amplificación de este gen resulta en un amplicón de 184 pb para líneas de sexo femenino (XX), y en dos amplicones de 184 pb y 208 pb para líneas de sexo masculino (XY). En total, se obtuvieron 4 líneas de sexo femenino y 6 líneas de sexo masculino para las condiciones NBFR, mientras en el caso de las condiciones TPFR, la totalidad de las líneas obtenidas fueron de sexo masculino (Tabla II, Figura 20).

**Tabla II: Eficiencia de derivación de células madre embrionarias bovinas en condiciones NBFR o TPFR a partir de blastocistos individuales, grupos de blastocistos o MCI aislados por inmuno-cirugía.** En la tabla se indica la condición de cultivo empleada, el material de partida utilizado, la cantidad de réplicas, la cantidad de blastocistos/MCI adheridos a los iMEF, la proporción de cada sexo obtenido para las líneas y la eficiencia de derivación (líneas establecidas sobre el total de blastocistos/MCI adheridos a los iMEF). ANOVA, diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) indicadas con letras distintas.

Condición de Cultivo	Material de partida	Réplicas	Blastocistos/MCI adheridos a los iMEF	Sexo femenino (%)	Sexo masculino (%)	Eficiencia de derivación (%)
NBFR	Blastocisto individual	8	28	37,5% (3/8)	-	29% (8/28)
NBFR	Grupos de blastocistos	2	3	100% (1/1)	-	33% (1/3)
NBFR	MCI inmuno-cirugía	2	4	-	100% (1/1)	25% (1/4)
TPFR	Blastocisto individual	3	10	-	100% (3/3)	30% (3/10)

ANOVA,  $p > 0,05$



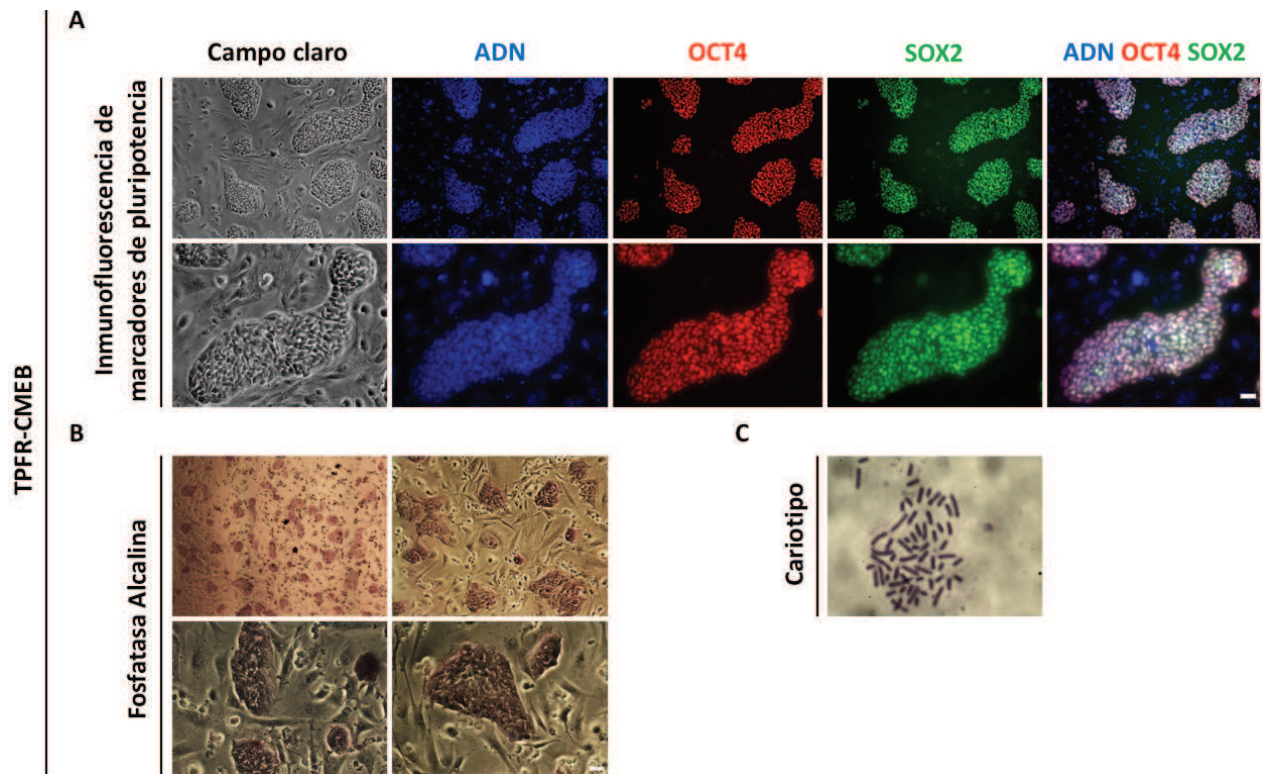
**Figura 20: Determinación del sexo en las líneas de células madre embrionarias bovinas.** Gel de agarosa 3% m/v teñido con bromuro de etidio que muestra los amplicones resultantes de la amplificación del gen *Ddx3*. PM 100pb: Marcador de peso molecular de 100pb. Fibro XY: fibroblastos derivados de un toro utilizados como control de sexo masculino. Línea TPFR: línea de CMEB derivada en condiciones TPFR. Fibro XX: fibroblastos derivados de una hembra utilizados como control de sexo femenino. Línea NBFR: línea de CMEB derivada en condiciones NBFR. C- H<sub>2</sub>O: control negativo de PCR donde se colocó agua en lugar de ADN genómico. Se determinó el sexo en las 13 líneas de CMEB obtenidas.

Independientemente de la utilización de blastocistos completos o MCI aislados, la eficiencia global de establecimiento de CMEB bajo condiciones NBFR (NBFR-CMEB) fue de aproximadamente un 30% sin observarse un sesgo sexual. Esta eficiencia fue equivalente a la obtenida en las condiciones TPFR (TPFR-CMEB) (ANOVA,  $p > 0,05$ ). En conjunto, estos resultados indican que las condiciones NBFR y TPFR pueden ser utilizadas para derivar líneas de células madre embrionarias bovinas con igual eficiencia.

### **3.4: Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas establecidas en condiciones NBFR y TPFR. Marcadores de pluripotencia y estabilidad genómica.**

Habiendo logrado establecer líneas bajo condiciones NBFR y TPFR, el siguiente paso fue caracterizarlas para validar su estado pluripotente. Para ello, se realizaron los ensayos sugeridos por la Iniciativa Internacional de Células Madre <sup>263</sup>, los cuales incluyen: evaluación de la morfología, estabilidad cromosómica y proliferación celular, determinación de la expresión de marcadores de pluripotencia y antígenos de superficie, y evaluación de la capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*.

Tanto en la condición NBFR como en la TPFR, las CMEB crecieron en colonias compactas y planas con bordes definidos, con una elevada relación núcleo-citoplasma. Además, fueron fácilmente disociadas por acción enzimática desde el primer pasaje. Las células pudieron ser amplificadas hasta una relación 1:10 cada 3-4 días, lo que evidenciaba una alta tasa proliferativa. Mediante un ensayo colorimétrico, pudimos comprobar que las líneas celulares exhibían actividad de la enzima fosfatasa alcalina (Figura 21B, 22B). Asimismo, mediante inmunofluorescencia demostramos que las células expresaban homogéneamente los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 (Figura 21A, 22A). Finalmente, mediante el estudio del cariotipo se verificó el número de cromosomas, y observamos que el 90% de las células poseían 60 cromosomas, corroborando la euploidia de las células bovinas (Figura 21C, 22C). Por cuestiones de tiempo y de disponibilidad de reactivos, no pudimos continuar la caracterización de las líneas celulares derivadas en condiciones TPFR. Sin embargo, cabe destacar que estas células pudieron ser cultivadas *in vitro* hasta el pasaje 15 sin demostrar cambios cualitativos en su morfología o velocidad de crecimiento.

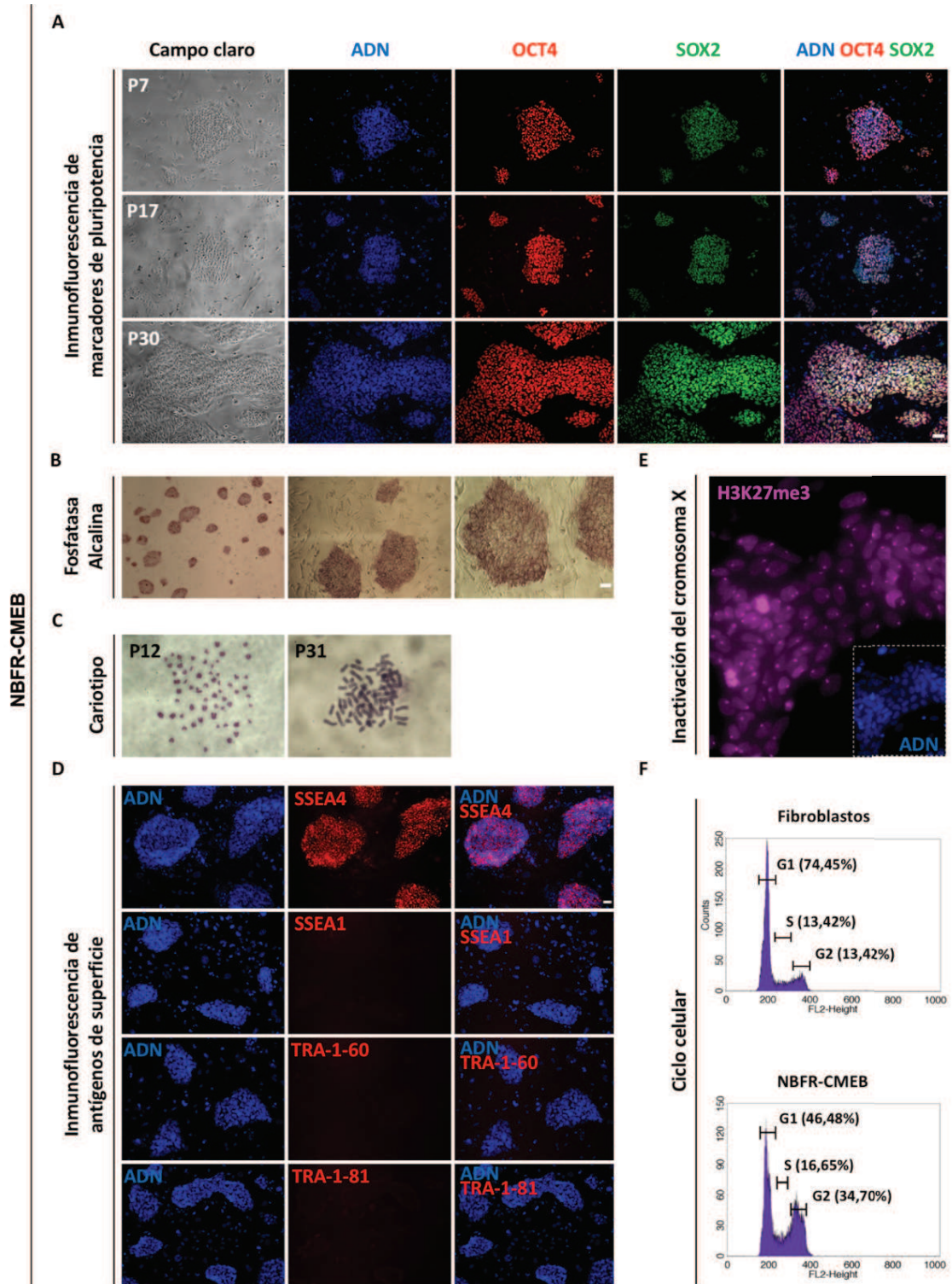


**Figura 21:** Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas en condiciones TPFR. **A.** Detección de la expresión de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en líneas TPFR-CMEB en pasaje 11. Los iMEF fueron usados como control negativo. **B.** Ensayo de fosfatasa alcalina en líneas TPFR-CMEB en pasaje 5 y 10. Los iMEF fueron usados como control negativo. **C.** Análisis del cariotipo en las líneas TPFR-CMEB en pasaje 12 mostrando la presencia de 60 cromosomas (2n). Se contaron en promedio 30 metafases por muestra. Las 3 líneas de CMEB obtenidas en condiciones TPFR fueron independientemente validadas. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

Durante la caracterización de las líneas en condiciones NBFR, decidimos también evaluar la expresión de proteínas de membrana características de células embrionarias en otras especies como SSEA4, SSEA1, TRA-1-60 y TRA-1-81. Las CMEB mostraron ser positivas para la expresión de SSEA4 y negativas para los antígenos de superficie SSEA1, TRA-1-60 y TRA-1-81 (Figura 22D). Además, decidimos estudiar el estado del cromosoma X en las CMEB obtenidas como indicador de su estado de pluripotencia. Para ello evaluamos mediante inmunofluorescencia la presencia de dominios/focos perinucleares positivos para H3K27me3 en células de sexo femenino, lo cual es indicativo de la presencia de un cromosoma X inactivo. Observamos que el 100% de las CMEB de sexo femenino presentaban un foco perinuclear de H3K27me3 (Figura 22E), indicando la presencia de un cromosoma X inactivo, y por lo tanto, su semejanza con el estado de pluripotencia

*primed*. Por otra parte, el estudio del ciclo celular reveló que las líneas NBFR poseían una fase G1 más acotada en comparación a las células somáticas, indicando que las CMEB poseían un menor tiempo de duplicación <sup>264</sup> (Figura 22F). Las líneas NBFR pudieron ser cultivadas *in vitro* por extendidos periodos de tiempo (> pasaje 35) sin que se observaran cambios morfológicos, alteraciones cromosómicas o modificaciones en la expresión de los marcadores de pluripotencia (Figura 22).



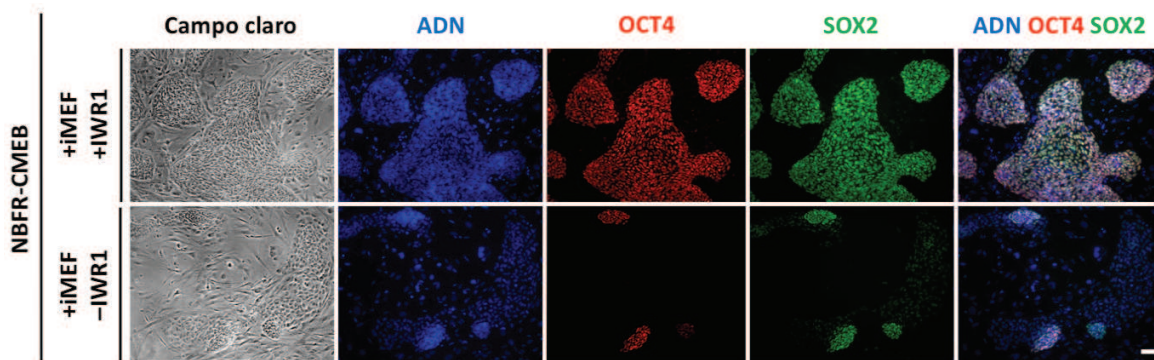


**Figura 22:** Caracterización de las líneas de CMEB en condiciones NBFR. **A.** Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en líneas NBFR-CMEB en pasaje 7, 17 y 30 (P7, P17 y P30, respectivamente). Los iMEF fueron usados como control negativo. **B.** Ensayo de fosfatasa alcalina en líneas

NBFR-CMEB en pasaje 14. Los iMEF fueron usados como control negativo. **C.** Análisis del cariotipo en líneas NBFR-CMEB en pasaje 12 y 31 (P12 y P31, respectivamente), mostrando la presencia de 60 cromosomas (2n). Se contaron en promedio 30 metafases por muestra. **D.** Detección de los antígenos de superficie SSEA4, SSEA1, TRA-1-60, TRA-1-81 por inmunofluorescencia en líneas NBFR-CMEB en pasaje 10. **E.** Detección de la marca H3K27me3 por inmunofluorescencia para detectar la inactivación del cromosoma X en líneas NBFR-CMEB de sexo femenino. **F.** Análisis del ciclo celular en fibroblastos y NBFR-CMEB mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Las 10 líneas NBFR-CMEB fueron independientemente validadas mediante inmunofluorescencia para los factores de pluripotencia, ensayo de fosfatasa alcalina y cariotipo. El estudio del ciclo celular y de antígenos de superficie fue realizado en únicamente 2 líneas NBFR-CMEB. El ensayo de la inactivación del cromosoma X fue realizado en 3 líneas NBFR-CMEB femeninas, y en NBFR-CMEB masculinas y fibroblastos femeninos como control negativo y positivo, respectivamente. Escala correspondiente a 100  $\mu\text{m}$ .

Durante el establecimiento y mantenimiento de las primeras líneas de CMEB en condiciones CTFR, los autores demostraron que la adición del inhibidor de la vía de Wnt (IWR1) era indispensable para mantener a las células indiferenciadas en cultivo ya que cuando no se incluía al inhibidor, las células rápidamente perdían la expresión de los marcadores de pluripotencia<sup>193</sup>. Debido a que durante este trabajo utilizamos al medio NBFR en lugar del medio CTFR para derivar líneas de CMEB, analizamos si el uso de IWR1 también era necesario para el mantenimiento de la pluripotencia de las CMEB en estas nuevas condiciones. Con este fin, las NBFR-CMEB fueron cultivadas sobre iMEF durante 4 pasajes (2 semanas) en presencia del medio NBFR con (condición control) o sin el inhibidor IWR1 (Tabla X, sección 6.21), y se analizó la expresión de los marcadores OCT4 y SOX2 por inmunofluorescencia.

Observamos que cuando el IWR1 fue removido, la mayoría de las células perdieron su morfología de crecimiento en colonias y la expresión de OCT4 y SOX2 (+iMEF -IWR1, Figura 23); mientras que en presencia del inhibidor, las células formaban colonias compactas y expresaban homogéneamente los marcadores de pluripotencia (+iMEF +IWR1, Figura 23).



**Figura 23:** Efecto de IWR1 sobre la proliferación y pluripotencia de las células madre embrionarias bovinas cultivadas sobre iMEF. Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre iMEF en presencia (+iMEF +IWR1) o ausencia (+iMEF -IWR1) de IWR1 por 4 pasajes. El ensayo fue realizado para dos líneas NBFR-CMEB independientes cultivadas sobre iMEF. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

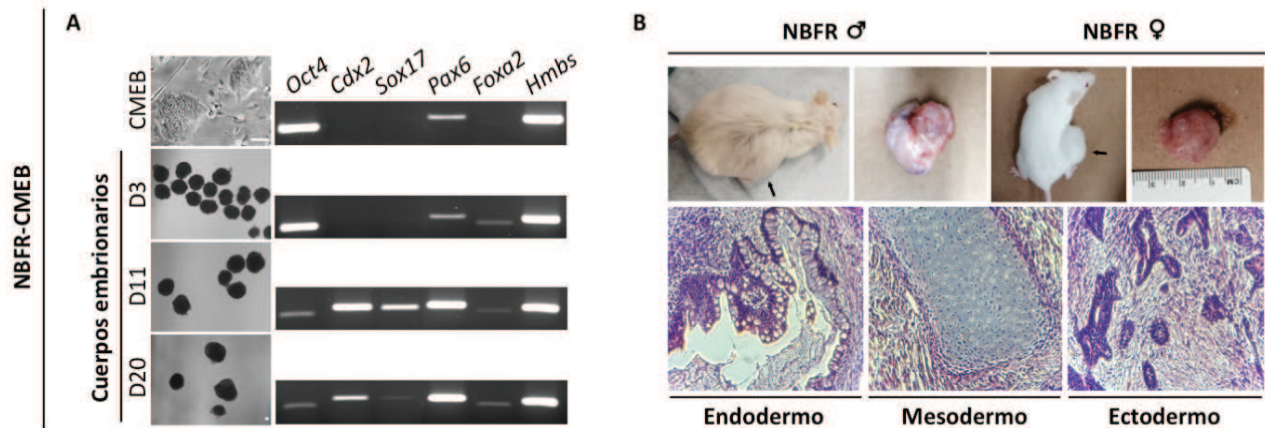
En conclusión, los resultados aquí expuestos demuestran que tanto las condiciones TPFr como las condiciones NBFR pueden ser utilizadas para mantener a las CMEB en un estado indiferenciado *in vitro*. Además, las condiciones NBFR mostraron la capacidad de conservar por largos períodos de tiempo las características pluripotentes y estabilidad genómica de las CMEB. Finalmente, observamos que al igual que lo reportado para las líneas CTFR-CMEB, en las condiciones NBFR-CMEB, inhibir la vía de señalización de Wnt mediante el uso del IWR1 es necesario para mantener las características pluripotentes de las CMEB.

### 3.5: Potencialidad de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas en condiciones NBFR. Diferenciación *in vitro* e *in vivo*.

La pluripotencia celular está principalmente definida por la capacidad de las células de originar derivados de las tres capas de tejido embrionario que incluyen el ectodermo, mesodermo y endodermo. Los ensayos de diferenciación *in vitro* e *in vivo* más comúnmente utilizados son la formación de cuerpos embrionarios y de teratomas, respectivamente. Los cuerpos embrionarios son estructuras tridimensionales que simulan, en parte, la compleja estructura multicelular que se genera durante los primeros estadios del desarrollo embrionario *in vivo* <sup>265</sup>. Durante este trabajo, las células madre embrionarias bovinas en medio NBFR fueron sometidas a un ensayo de diferenciación *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrionarios en gota en suspensión (del

inglés “*hanging drop*”). Los cuerpos embrionarios formados fueron transferidos individualmente a un pocillo de baja adherencia y cultivados por al menos 3 semanas en medio de diferenciación el cual incluía 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) en su formulación como agente diferenciante. Se determinó por PCR a punto final la expresión de marcadores de pluripotencia y de derivados de las 3 capas germinales. Como control de carga, se utilizó el gen *Hmbs* el cual se expresa de forma constante y constitutiva en las células.

En ausencia de un agente diferenciante, las células expresaron el marcador de pluripotencia *Oct4* pero también el marcador de ectodermo *Pax6* (Figura 24A). A los 3 días de diferenciación, las células continuaron expresando *Oct4* y *Pax6*, pero comenzaron a expresar el marcador endodérmico *Foxa2* (Figura 24A). Luego de 11 a 20 días de diferenciación, las células continuaron expresando *Pax6* y *Foxa2* y mostraron una expresión atenuada del marcador de pluripotencia *Oct4*. Asimismo, se detectó expresión de los marcadores *Cdx2* (marcador mesodérmico) y *Sox17* (marcador endodérmico) a día 11 y 20 de diferenciación (Figura 24A). Esta variación temporal en la expresión de los distintos marcadores coincide con las oleadas de expresión que han sido descritas *in vivo* para diversas especies, pues se necesita que ciertos factores de transcripción se activen de forma transitoria en el momento específico durante la determinación de los distintos linajes. En conclusión, pudimos demostrar la capacidad de las células de ser diferenciadas *in vitro* en presencia de SFB.



**Figura 24: Potencial de diferenciación de las NBFR-CMEB.** **A.** Diferenciación *in vitro* de las NBFR-CMEB mediante la formación de cuerpos embrionarios. Imágenes en campo claro de las NBFR-CMEB y de los cuerpos embrionarios a día 3, 11 y 20 de diferenciación (D3, D11 y D20, respectivamente). Gel de agarosa 3% m/v teñido con bromuro de etidio donde se observan los amplicones resultantes de la amplificación de marcadores de pluripotencia (*Oct4*), marcadores de endodermo (*Sox17*, *Foxa2*), marcadores de mesodermo (*Cdx2*) y marcadores de ectodermo (*Pax6*). La amplificación del gen *Hmbs* fue utilizada como control de carga. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m. **B.** Diferenciación *in vivo* de dos líneas NBFR-CMEB evaluada por la formación de teratomas luego de 3 meses de ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos. Se pueden ver los teratomas en los dos ratones y un ejemplo de la evaluación histológica de los mismos, observándose la presencia de derivados representativos de endodermo, mesodermo y ectodermo. Los ensayos de diferenciación fueron realizados para dos líneas NBFR-CMEB independientes (una de cada sexo). Se utilizaron 4 ratones inmunosuprimidos para evaluar la capacidad teratogénica de cada línea.

A continuación, se evaluó la capacidad de las células de diferenciarse *in vivo* mediante el ensayo de formación de teratomas los cuales son tumores que poseen tejidos representativos de las 3 capas germinales. Con este fin, una línea de sexo masculino en pasaje 12 y una línea de sexo femenino en pasaje 14, fueron inyectadas subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos. Luego de 3 meses, se obtuvieron teratomas de aproximadamente 2 cm de diámetro para cada línea. Los ratones fueron sacrificados y el tumor fue removido y diseccionado para comprobar histológicamente la presencia de derivados representativos de los tres linajes embrionarios. Como puede observarse en la Figura 24B, los tumores obtenidos estaban formados por tejidos representativos del linaje ectodérmico (neuroepitelio), mesodérmico (cartílago) y endodérmico (epitelio glandular), demostrando la capacidad teratogénica de las células evaluadas.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, podemos afirmar que las CMEB establecidas y mantenidas en condiciones NBFR pueden ser cultivadas por extendidos periodos de tiempo,

manteniendo sus características pluripotentes y su potencial de diferenciación, siendo capaces de generar derivados de las tres capas germinales, demostrando su auténtico estado pluripotente.

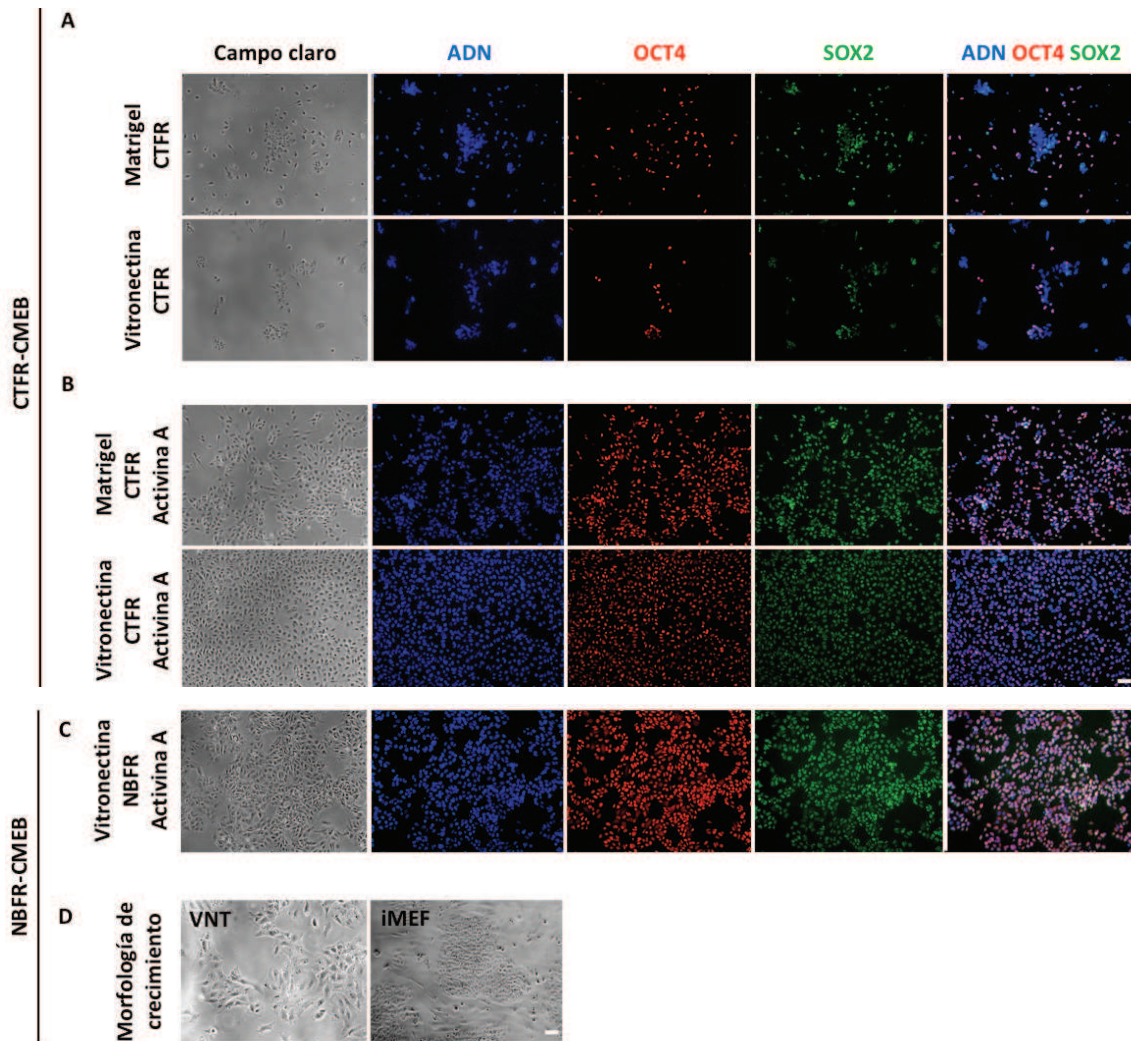
### **3.6: Cultivo de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas en condiciones CTFR y NBFR en ausencia de iMEF.**

Habiendo encontrado alternativas comerciales que podían ser utilizadas para derivar y mantener las características pluripotentes de las células madre embrionarias bovinas, continuamos por buscar sustratos alternativos para reemplazar el uso de los iMEF con el fin de continuar simplificando aún más las condiciones de cultivo.

Obtener condiciones de cultivo que permitan cultivar células madre en ausencia de iMEF evitaría trabajar con co-cultivos y significaría un gran avance para lograr tener condiciones de cultivo más reproducibles y definidas, ya que gran parte de los factores secretados por los fibroblastos murinos aún no han sido descriptos. Por esta razón, evaluamos sustratos como la proteína recombinante humana Vitronectina y el Matrigel, los cuales han sido empleados exitosamente en el cultivo de células madre pluripotentes de otras especies <sup>250,251,266-268</sup>.

Comenzamos por evaluar la capacidad de las células madre embrionarias bovinas obtenidas en condiciones CTFR de crecer en ausencia de iMEF. Para ello, las líneas CTFR-CMEB fueron cultivadas en presencia de Matrigel o Vitronectina por 4 pasajes, y evaluamos la tasa de crecimiento de forma cualitativa y la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2. Luego de 4 pasajes, las células cultivadas tanto en Vitronectina como en Matrigel mostraron una disminución considerable en la tasa proliferativa y en la expresión de los marcadores de pluripotencia, principalmente de OCT4 (Figura 25A). Está reportado que la Activina A es uno de los factores secretados por los iMEF y que participa en el mantenimiento de la pluripotencia de células madre pluripotentes humanas en condiciones libres de iMEF <sup>269</sup>. Por lo tanto, a continuación analizamos si suplementar el medio CTFR con 20 ng/mL de este factor era suficiente para mantener la tasa de crecimiento y la expresión de los marcadores de pluripotencia de las células en ausencia de iMEF. Como resultado observamos que, luego de 4 pasajes sobre ambas matrices, las células recuperaron su tasa proliferativa y mostraron una expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia (Figura 25B).

Considerando que la Vitronectina es un soporte más definido que el Matrigel, y que la Activina A resultó esencial para la auto-renovación y pluripotencia de las células, se utilizaron estos componentes para evaluar si las líneas NBFR-CMEB podían ser cultivadas en ausencia de iMEF. Al igual que las líneas CTFR-CMEB, las líneas NBFR-CMEB fueron exitosamente cultivadas sobre Vitronectina cuando el medio NBFR fue suplementado con 20 ng/mL de Activina A (VTN-NBFR-CMEB) (Figura 25C). Llamativamente, en ambas condiciones (CTFR y NBFR), las líneas exhibieron una alteración en su morfología de crecimiento ya que crecieron formando una monocapa celular en lugar de crecer en colonias. Sin embargo, cuando las VTN-NBFR-CMEB fueron sembradas nuevamente sobre una monocapa de iMEF, éstas recuperaron su fenotipo, volviendo a crecer en colonias compactas (Figura 25D).



**Figura 25:** Cultivo de las líneas CTFR-CMEB y NBFR-CMEB en ausencia de iMEF. **A.** Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en líneas CTFR-CMEB cultivadas por 4 pasajes sobre Matrigel o Vitronectina utilizando el medio CTFR. **B.** Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en líneas CTFR-CMEB cultivadas por 4 pasajes sobre Matrigel o Vitronectina utilizando el medio CTFR suplementado con Activina A. **C.** Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en líneas NBFR-CMEB cultivadas por 4 pasajes sobre Vitronectina utilizando el medio NBFR suplementado con Activina A. **D.** Fotomicrografías en campo claro que muestran la morfología de crecimiento de las CMEB cultivadas sobre Vitronectina (VNT) o sobre Vitronectina (durante 10 pasajes) y luego sobre iMEF. Dos líneas CTFR-CMEB y NBFR-CMEB independientes fueron analizadas. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

En base a estos resultados, demostramos que las líneas de células madre embrionarias bovinas establecidas en condiciones CTFR y NBFR pueden ser cultivadas en sustratos libres de iMEF en



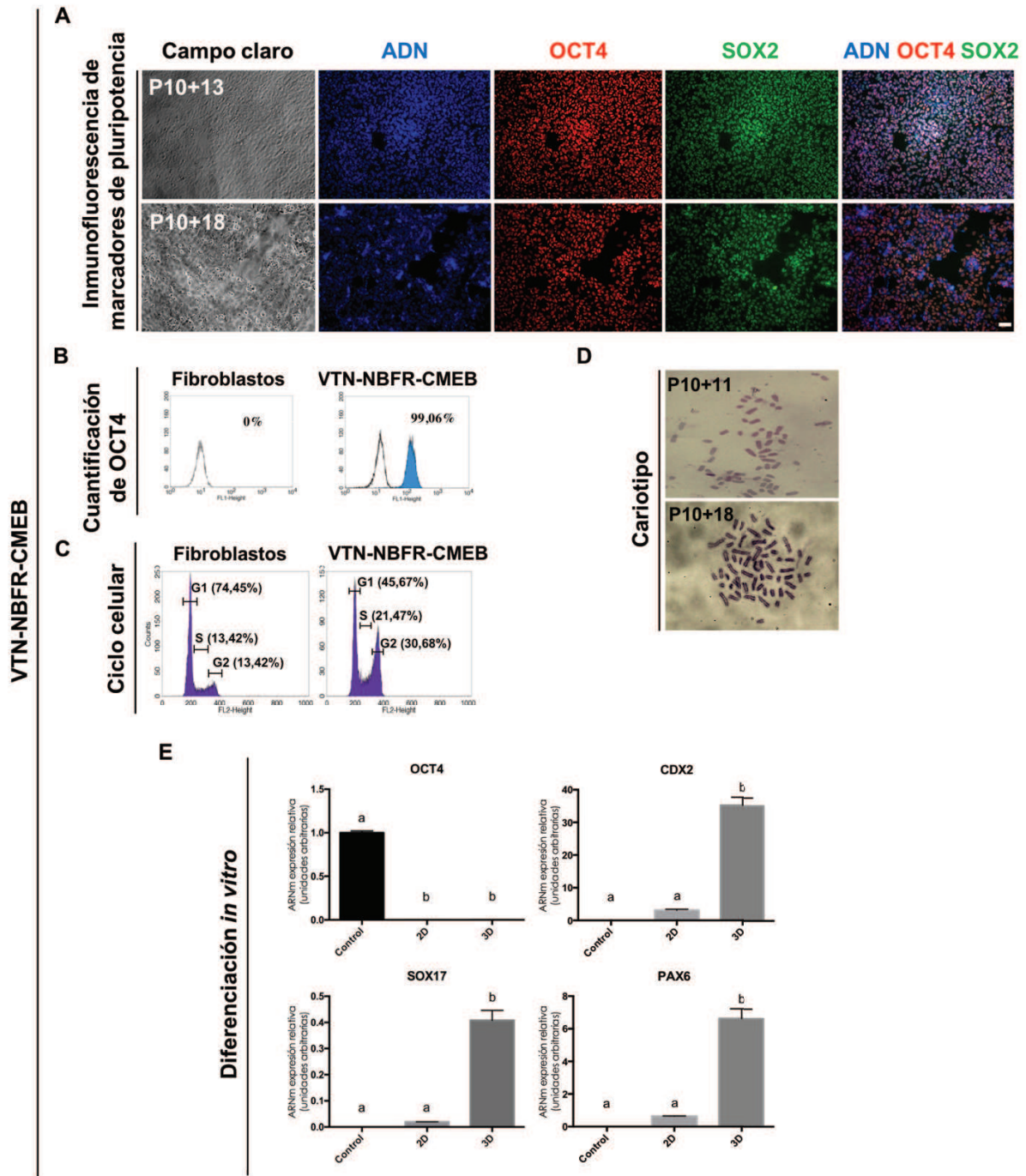
presencia de Activina A, manteniendo la capacidad proliferativa y expresión de los marcadores de pluripotencia.

### **3.7: Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas en condiciones NBFR y cultivadas sobre Vitronectina. Evaluación de la proliferación, expresión de marcadores de pluripotencia, potencialidad y estabilidad genómica.**

Una vez que comprobamos que las células madre embrionarias bovinas obtenidas en condiciones NBFR podían ser cultivadas sobre Vitronectina en presencia de Activina A, el siguiente paso fue validar su estado pluripotente. Para ello, evaluamos su capacidad proliferativa, la expresión de marcadores de pluripotencia y estabilidad genómica a lo largo del tiempo, y su potencial de diferenciación *in vitro*.

Similar a lo previamente descrito para las líneas NBFR-CMEB en presencia de iMEF, las células cultivadas sobre Vitronectina podían ser disociadas utilizando un tratamiento enzimático y amplificadas en una relación 1:10 cada 3-4 días. Las células cultivadas sobre Vitronectina mantuvieron su tasa de crecimiento y expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 por períodos de tiempo extendidos (> pasaje 30) (Figura 26A). Reforzando estas observaciones, se cuantificó la proporción de células que expresaban OCT4 mediante inmunomarcación y citometría de flujo. Como se observa en la figura 26B, el 99% de las NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina fueron positivas para la expresión del marcador de pluripotencia, mientras que en células somáticas la expresión de OCT4 no fue detectada. Al analizar el ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo, pudimos ver que las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina mostraron un perfil del ciclo celular similar a las líneas NBFR cultivadas sobre iMEF y distinto al perfil obtenido para los fibroblastos. La fase G1 del ciclo celular fue de aproximadamente 1,5 veces más corta en las NBFR cultivadas con o sin iMEF en comparación a la fase G1 obtenida para los fibroblastos (Figura 26C). A continuación, para validar la estabilidad genómica, se analizó el cariotipo de las células a lo largo del tiempo, y observamos que el 88% de las células presentaban en un cariotipo normal de 60 cromosomas (Figura 26D). Finalmente, se realizó el ensayo de diferenciación *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrionarios para evaluar la capacidad de diferenciación de las células, y

se cuantificó la expresión de marcadores de los distintos linajes embrionarios por PCR en tiempo real. El cultivo de los cuerpos embrionarios fue realizado de dos maneras: un grupo fue mantenido en suspensión durante 2 semanas (3D), y el otro grupo al cabo de 14 días en suspensión, fue transferido a una placa tratada con gelatina por 2 semanas más para ser cultivado en adherencia (2D). Como se puede observar en la Figura 26E, luego de la inducción de la diferenciación en 3D o 2D, las líneas perdieron la expresión de *Oct4* y comenzaron a expresar genes representativos de cada linaje como *Cdx2* (mesodermo), *Pax6* (ectodermo) y *Sox17* (endodermo), demostrando su capacidad de diferenciarse *in vitro* a derivados de las tres capas embrionarias.



**Figura 26:** Caracterización de las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina. **A.** Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina utilizando el medio NBFR suplementado con Activina A. Se muestra la expresión de los marcadores de pluripotencia luego de varios pasajes sobre Vitronectina. P10 se refiere al número de pasajes en que las células fueron cultivadas sobre iMEF (10 pasajes) y +X al número de pasajes sobre Vitronectina. **B.** Cuantificación de OCT4 mediante inmunomarcación y citometría de flujo en fibroblastos y NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina (VTN-

NBFR-CMEB). El pico azul corresponde a las células OCT4<sup>+</sup>, mientras que el pico incoloro corresponde al control negativo donde se utilizó el anticuerpo secundario en ausencia del anticuerpo primario. **C.** Análisis del ciclo celular en fibroblastos y líneas de NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina (VTN-NBFR-CMEB) mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. **D.** Análisis del cariotipo de las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina por 11 o 18 pasajes (P10+11 y P10+18, respectivamente), mostrando la presencia de 60 cromosomas (2n). **E.** Diferenciación *in vitro* de las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina (VTN-NBFR-CMEB) mediante la formación de cuerpos embrionarios. Se muestra la expresión relativa ( $\pm$  el error estándar) de los genes *Oct4* (marcador de pluripotencia), *Cdx2* (marcador de mesodermo), *Pax6* (marcador de ectodermo) y *Sox17* (marcador de endodermo) normalizados a la expresión del gen *Hmbs* en condiciones sin diferenciar (control) y luego de 4 (2D) y 3 semanas (3D) de diferenciación. La expresión relativa fue calculada según el método de  $\Delta\Delta CT$ . Letras distintas indican diferencias significativas (test de ANOVA y test de comparaciones múltiples Tukey,  $p < 0,05$ ). Cuatro líneas NBFR-CMEB independientes fueron cultivadas sobre Vitronectina y validadas por inmunofluorescencia. Tres líneas NBFR-CMEB independientes fueron cultivadas sobre Vitronectina y se evaluó su potencial de diferenciación. Dos líneas NBFR-CMEB independientes fueron cultivadas sobre Vitronectina y estudiadas por citometría de flujo y análisis del cariotipo. Escala correspondiente a 100  $\mu m$ .

En conclusión, las líneas NBFR-CMEB pueden ser cultivadas sobre Vitronectina en presencia de Activina A, manteniendo su capacidad de auto-renovación, expresión de los marcadores de pluripotencia, estabilidad cromosómica y potencial de diferenciación.

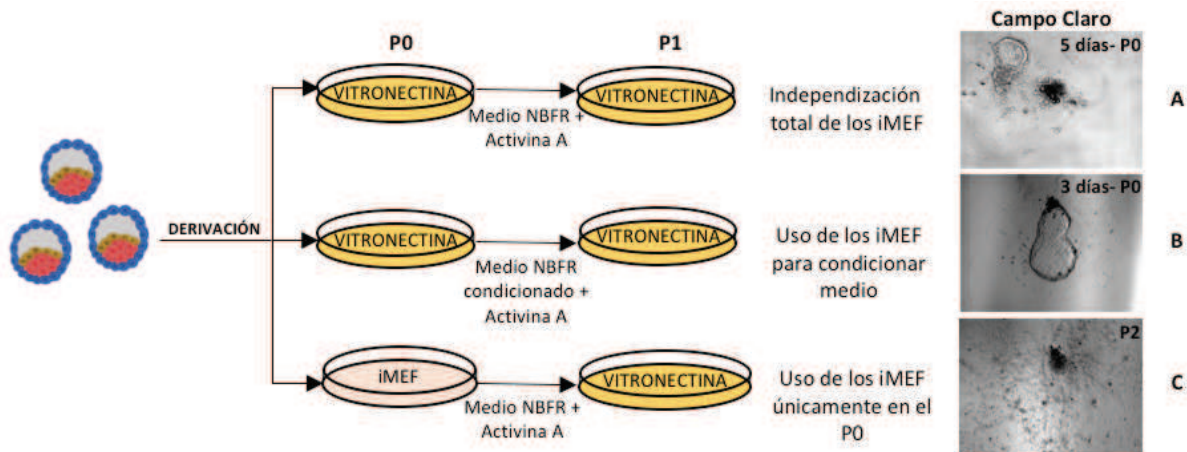
### **3.8: Derivación y cultivo de células madre embrionarias bovinas utilizando el medio NBFR en ausencia total o parcial de los iMEF.**

Logramos demostrar que tanto las líneas CTFR-CMEB como las NBFR-CMEB, podían ser cultivadas sobre Vitronectina cuando el medio de cultivo era suplementado con Activina A. A continuación, decidimos evaluar si las CMEB podían ser directamente derivadas sobre Vitronectina, sin la necesidad de utilizar iMEF, en presencia del medio NBFR y Activina A. Con ese fin, planteamos 3 posibles condiciones de derivación en donde cada una reducía el uso de los iMEF de forma total o parcial (Figura 27). En todos los casos, se utilizaron grupos de 3-4 blastocistos de día 7 de desarrollo embrionario producidos por fecundación *in vitro* para derivar las líneas.

La condición A consistió en independizarnos totalmente del uso de los iMEF, y realizamos la derivación de las CMEB sobre Vitronectina. En la condición B, utilizamos Vitronectina como sustrato en la derivación de las CMEB pero empleamos medio condicionado por los iMEF para su

cultivo. El medio condicionado es producto de cultivar a los iMEF con un medio a elección (en este caso el medio NBFR) por 72 h para que el mismo se enriquezca con los factores secretados por los iMEF. Esta condición permite estudiar el rol de los iMEF en el cultivo, discriminando si su uso resulta indispensable por los factores liberados al medio o por su acción como soporte físico durante el cultivo de las CMEB. Además, esta condición permite trabajar en ausencia de un co-cultivo de células provenientes de distintas especies. Finalmente, la condición C consistió en cultivar los blastocistos sobre iMEF durante el pasaje cero con el fin de brindar el soporte y los factores secretados por los iMEF durante el primer estadio de derivación, y luego continuamos los sucesivos pasajes sobre Vitronectina en presencia del medio NBFR suplementado con Activina A. En esta condición, el cultivo de las CMEB también se vería simplificado pues sólo se requeriría del uso de los iMEF durante el primer período de la derivación.

En todas las condiciones, los blastocistos sembrados sobre iMEF o Vitronectina se adhirieron exitosamente y se observó un halo de crecimiento alrededor del embrión (Figura 27A-C). En la condición A y B, el halo de crecimiento estaba conformado por células con morfología de tipo cuboideal, característico de células del TE, mientras que las células derivadas del epiblasto (pequeñas y redondeadas) eran minoritarias (Figura 27A-B). Luego de realizar el primer pasaje, en la condición A y B se formaron grupos celulares muy difíciles de disgregar con una coloración oscura, y no se observó proliferación de las células derivadas del epiblasto. Por esta razón, luego de 7 días desde el primer pasaje, se discontinuó el experimento para estas condiciones. En la condición C, se observó mayor cantidad de células derivadas del epiblasto las cuales llegaron a colonizar la totalidad del pocillo. Luego del primer pasaje las células fueron cultivadas sobre Vitronectina donde continuaron mostrando crecimiento de las células derivadas del epiblasto. Entre el pasaje 1 y 2, dependiendo de la línea celular, un 80% de la superficie del pocillo se encontraba cubierta de células, observándose una gran cantidad de células embrionarias (Figura 27C). Sin embargo, luego de estos pasajes, el crecimiento de las células se detuvo y se formaron agrupaciones celulares de color oscuro, al igual que en las otras condiciones, por lo que decidimos discontinuar el experimento.



**Figura 27: Derivación de células madre embrionarias bovinas sobre Vitronectina.** **A.** Esquema de derivación de las CMEB sobre Vitronectina utilizando el medio NBFR suplementado con Activina A. Fotomicrografía en campo claro del halo de crecimiento observado luego de 5 días post-derivación (5 días-P0). **B.** Esquema de derivación de las CMEB sobre Vitronectina utilizando medio condicionado NBFR suplementado con Activina A. Fotomicrografía en campo claro del halo de crecimiento observado luego de 3 días post-derivación (3 días-P0). **C.** Esquema de derivación de las CMEB sobre iMEF durante el pasaje cero (P0), y posteriores pasajes sobre Vitronectina utilizando el medio NBFR suplementado con Activina A. Fotomicrografía en campo claro del crecimiento celular observado durante el segundo pasaje (P2). Cada condición (A, B, C) fue repetida tres veces con grupos de 3 a 4 embriones.

En base a estos resultados, concluimos que las tres condiciones evaluadas no son suficientes para reemplazar al uso de los iMEF en la derivación de las CMEB. Consideramos que, durante los primeros estadios de derivación, las CMEB necesitan del soporte y/o de alguno/s de los factores secretados por los iMEF (citoquinas, componentes de matriz extracelular, etc) para poder proliferar y dominar el cultivo. Sin embargo, una vez que la línea ya ha sido establecida, las células pueden ser cultivadas en ausencia de iMEF y en presencia de Vitronectina, como demostramos previamente (Figura 26).

### 3.9: Estudio de las vías de señalización involucradas en la auto-renovación y pluripotencia de las células madre embrionarias bovinas.

Luego de haber reemplazado a los iMEF por matrices libres de células y al medio CTFR por el medio NBFR el cual consiste en la mezcla de menos de 10 reactivos comerciales, decidimos utilizar estas condiciones de cultivo para estudiar las distintas vías de señalización involucradas en

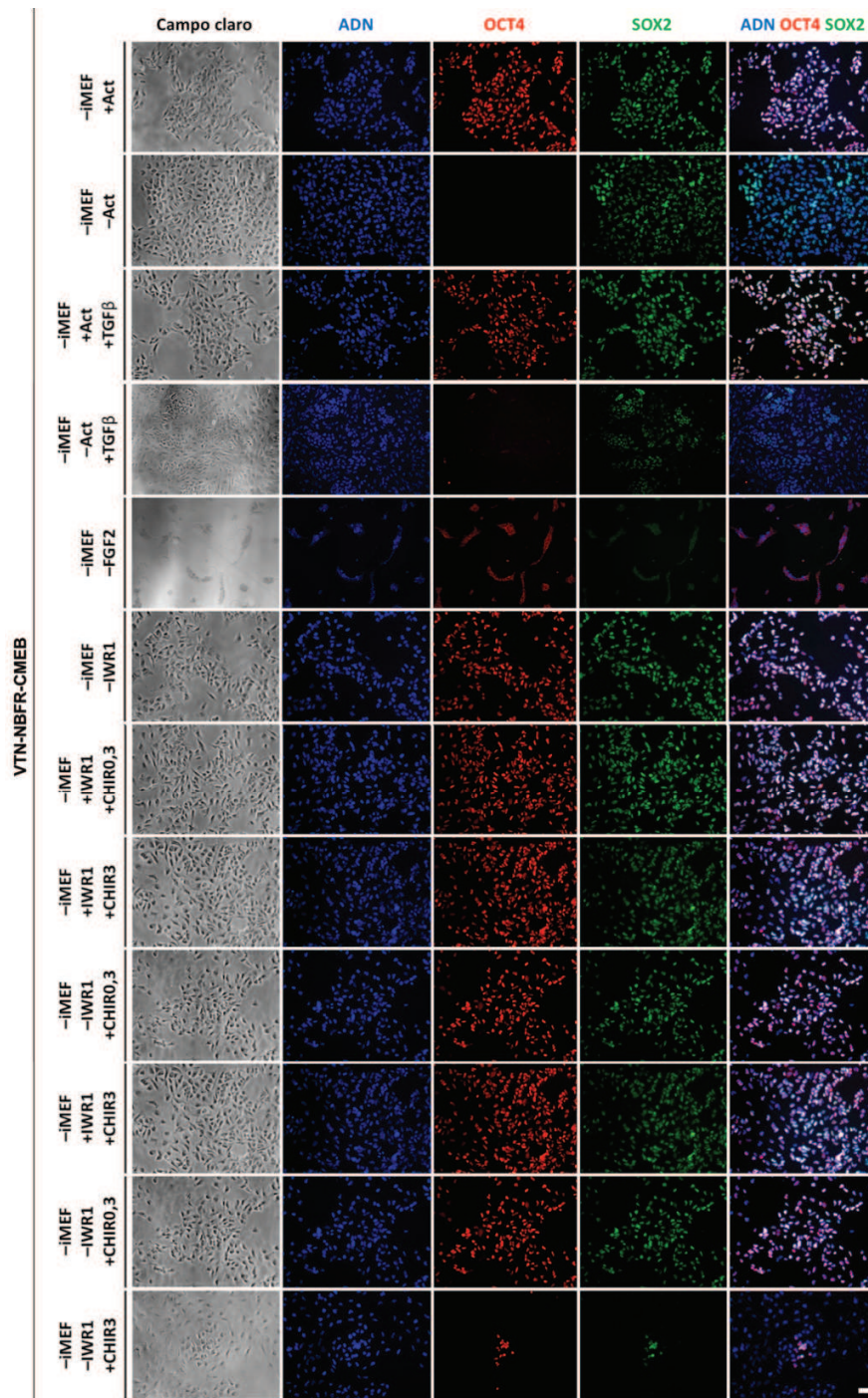
el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencia bovina. Para ello, las CMEB obtenidas en condiciones NBFR y cultivadas sobre Vitronectina fueron mantenidas durante 4 pasajes con distintas combinaciones de factores de crecimiento e inhibidores para luego evaluar su tasa de crecimiento de forma cualitativa y detectar la expresión de los marcadores OCT4 y SOX2 por inmunofluorescencia (Tabla X, sección 6.21).

Comenzamos por estudiar la superfamilia de TGF $\beta$  la cual incluye los factores TGF $\beta$ , Activina A y Nodal <sup>270</sup>. La Activina A ha sido relacionada con el mantenimiento de la pluripotencia mediante el control del marcador de pluripotencia NANOG mediado por proteínas SMAD en células madre pluripotentes murinas y humanas <sup>271</sup>. Durante este trabajo, observamos que este factor era necesario para que las CMEB cultivadas en condiciones CTFR y NBFR en ausencia de iMEF exhiban una proliferación activa junto a una expresión homogénea de los factores de pluripotencia dado que cuando la Activina A no era incluida en la formulación del medio, las células carecían de la expresión del factor OCT4 (Figura 25 y Figura 28 condición -iMEF+Act y -iMEF-Act.). Cabe destacar que aún en presencia de iMEF, las NBFR-CMEB cultivadas por más de 20 pasajes requirieron de la suplementación con Activina A para poder mantener su fenotipo a lo largo del tiempo. A continuación, considerando que el TGF $\beta$ 1 también interactúa con proteínas SMAD, estudiamos si este factor era capaz de sustituir la acción de la Activina A. Inicialmente corroboramos que la adición de TGF $\beta$ 1 al medio de cultivo no modificara el fenotipo de las VTN-NBFR-CMEB (-iMEF+Act+TGF $\beta$ 1). Efectivamente, la suplementación simultánea de Activina A y TGF $\beta$ 1 no afectó la expresión de los marcadores de pluripotencia y proliferación celular en comparación a la condición en donde únicamente se incluía a la Activina A (-iMEF+Act) (Figura 28). Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas en ausencia de Activina A y en presencia de TGF $\beta$ 1 (-iMEF-Act+TGF $\beta$ 1), no se detectó expresión del factor de pluripotencia OCT4 (Figura 28), demostrando que el factor TGF $\beta$ 1 no es capaz de reemplazar al factor Activina A en estas condiciones.

Posteriormente, estudiamos el rol del factor FGF2 el cual está involucrado en el mantenimiento de la auto-renovación y proliferación de células madre pluripotentes de distintas especies <sup>272,273</sup>. Luego de la remoción del FGF2 del medio de cultivo (-iMEF-FGF2), observamos que las CMEB detuvieron su crecimiento (Figura 28). De hecho, no fue posible continuar el experimento más allá de 2 pasajes (1 semana). Estos resultados indicaron que el factor FGF2 es esencial para mantener la proliferación y viabilidad de las CMEB.

Finalmente, analizamos el rol del inhibidor de la vía de señalización de Wnt IWR1 en la pluripotencia de las CMEB en condiciones libres de iMEF. La modulación de la vía de Wnt ha sido implicada en el mantenimiento de la pluripotencia de otras especies; y en la especie bovina se ha demostrado que el uso de IWR1 es necesario para mantener el estado indiferenciado de las células cuando éstas son cultivadas sobre iMEF<sup>193</sup> (Figura 23). Sin embargo, en condiciones libres de iMEF, la ausencia del inhibidor de la vía de Wnt (-iMEF-IWR1) no afectó la pluripotencia y proliferación de las VTN-NBFR-CMEB, ya que luego de 6 pasajes (3 semanas) sin IWR1, las células continuaron expresando OCT4 y SOX2 (Figura 28). Dado que ha sido reportado que los iMEF secretan factores que incluyen ligandos de la vía de Wnt<sup>211,212</sup>, creemos que en ausencia de estimulación (debido a la ausencia de iMEF), no sería necesario inhibir la vía de Wnt para mantener el estado pluripotente en las células bovinas. Para corroborar esto, decidimos analizar el estado pluripotente de las NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina en presencia del inhibidor CHIR99021 en distintas concentraciones, con o sin IWR1. CHIR99021 es un inhibidor de la GSK3b la cual es una quinasa que fosforila a la  $\beta$ -catenina marcándola como blanco de degradación por el complejo de Axinas/APC. De esta forma, en presencia de CHIR99021, la vía de señalización Wnt sería indirectamente activada, resultando en la estabilización de la  $\beta$ -catenina la cual actúa controlando la expresión de genes involucrados en la pluripotencia. Como se puede observar en la Figura 28, cuando las VTN-NBFR-CMEB eran cultivadas en ausencia de IWR1 y en presencia de altas concentraciones (3 $\mu$ M) del inhibidor CHIR99021, las células dejaron de expresar los marcadores OCT4 y SOX2 (iMEF-IWR1+CHIR3). Este efecto no pudo ser observado utilizando bajas concentraciones (0,3 $\mu$ M) de CHIR99021 (iMEF-IWR1+CHIR0,3), probablemente debido a que la activación de la vía es indirecta y se requieren mayores concentraciones del inhibidor para estimularla. Por el contrario, la inhibición y estimulación conjunta de la vía de Wnt utilizando IWR1 y CHIR99021, no afectó las características de las células (-iMEF +IWR1 +CHIR0,3 o -iMEF +IWR1 +CHIR3). En conjunto, estos resultados sugieren que la vía de Wnt debe estar inactiva para que las células madre embrionarias bovinas mantengan su estado indiferenciado.





**Figura 28:** Factores de crecimiento e inhibidores involucrados en el programa de proliferación y pluripotencia de las células madre embrionarias bovinas cultivadas sobre Vitronectina. Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas NBFR-CMEB cultivadas sobre Vitronectina en presencia o ausencia de Activina A, FGF2, IWR1, TGFβ1 y CHIR99021. Act= Activina A; CHIR0,3= CHIR99021 0,3μM; CHIR3= CHIR99021 3μM. El ensayo fue realizado para dos líneas NBFR-CMEB independientes cultivadas sobre Vitronectina. Escala correspondiente a 100 μm.

En conclusión, contar con condiciones de cultivo químicamente definidas para el cultivo de las CMEB nos permitió estudiar las distintas vías de señalización involucradas en el mantenimiento del estado pluripotente. Logramos identificar que en ausencia de los iMEF la inhibición de la vía de Wnt mediante el uso de IWR1 no produce cambios en la expresión de los factores de pluripotencia, sino que son las vías de señalización de Activina A y FGF2 las principales protagonistas encargadas de orquestar el programa de pluripotencia y auto-renovación celular bovina.

- **Capítulo 2: Estudio del epigenoma y transcriptoma de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos mediante distintas técnicas de biotecnologías reproductivas.**

## **4: Capítulo 2: Resultados.**

Los resultados obtenidos en el capítulo 1 nos permitieron simplificar las condiciones de cultivo de las CMEB. En el presente capítulo evaluamos el transcriptoma y epigenoma de las CMEB derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS, con el fin de analizar si existían diferencias a nivel molecular en las células provenientes del MCI. Para ello, utilizamos las líneas derivadas en el capítulo 1 en condiciones NBFR en presencia de iMEF a partir de embriones individuales producidos por fecundación *in vitro*, y en paralelo, derivamos líneas de CMEB en condiciones NBFR en presencia de iMEF a partir de embriones individuales producidos por transferencia nuclear de células somáticas. Además, debido a que contábamos con un gran número de embriones diploides y haploides producidos por activación partenogenética, decidimos derivar líneas de CMEB a partir de éstos.

Una vez obtenidas las líneas provenientes de las distintas fuentes embrionarias, las mismas fueron brevemente caracterizadas analizando su morfología, expresión de marcadores de pluripotencia, actividad de la fosfatasa alcalina y su cariotipo. A continuación, se evaluó y comparó el perfil transcriptómico global y el patrón epigenético de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 entre las líneas provenientes de las distintas fuentes embrionarias y los fibroblastos utilizados como donantes nucleares durante la técnica de TNCS. Finalmente, se estudiaron las características de la cromatina a lo largo de todo el genoma, focalizándonos específicamente en las regiones promotoras. De esta forma, utilizando a las CMEB como modelo de estudio, pudimos aportar información acerca del nivel de reprogramación alcanzado por el MCI de embriones producidos por TNCS.

### **4.1: Derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas a partir de embriones producidos por transferencia nuclear de células somáticas y activación partenogenética.**

Se produjeron embriones bovinos mediante la técnica de TNCS y activación partenogenética, para luego derivar líneas de CMEB a partir de cada fuente embrionaria. La producción de embriones diploides y haploides por partenogénesis se refiere a la activación química de un oocito maduro, el cual se divide en ausencia de un espermatozoide y es una

herramienta que se utiliza como control de la técnica de TNCS con el fin de evaluar la calidad oocitaria, la activación química y las condiciones de cultivo. La obtención de CMEB a partir de estos embriones significaría una valiosa herramienta para estudiar en profundidad la contribución de factores únicamente maternos durante el desarrollo embrionario y el *imprinting* génico.

Para producir embriones mediante TNCS y/o activación partenogenética, se utilizaron oocitos provenientes de animales de faena de frigoríficos locales. En el caso de los embriones producidos por TNCS, se utilizaron fibroblastos fetales cutáneos de un macho bovino de raza sintética (*Bos indicus/Bos Taurus*) como células donantes.

Durante la producción *in vitro* de embriones, se obtuvo un 55% de producción de blastocistos en el caso de FIV, un 33% en el caso de TNCS, un 45% en el caso de la producción de embriones diploides por activación partenogenética, y un 12% en el caso de la producción de embriones haploides por activación partenogenética (Tabla III).

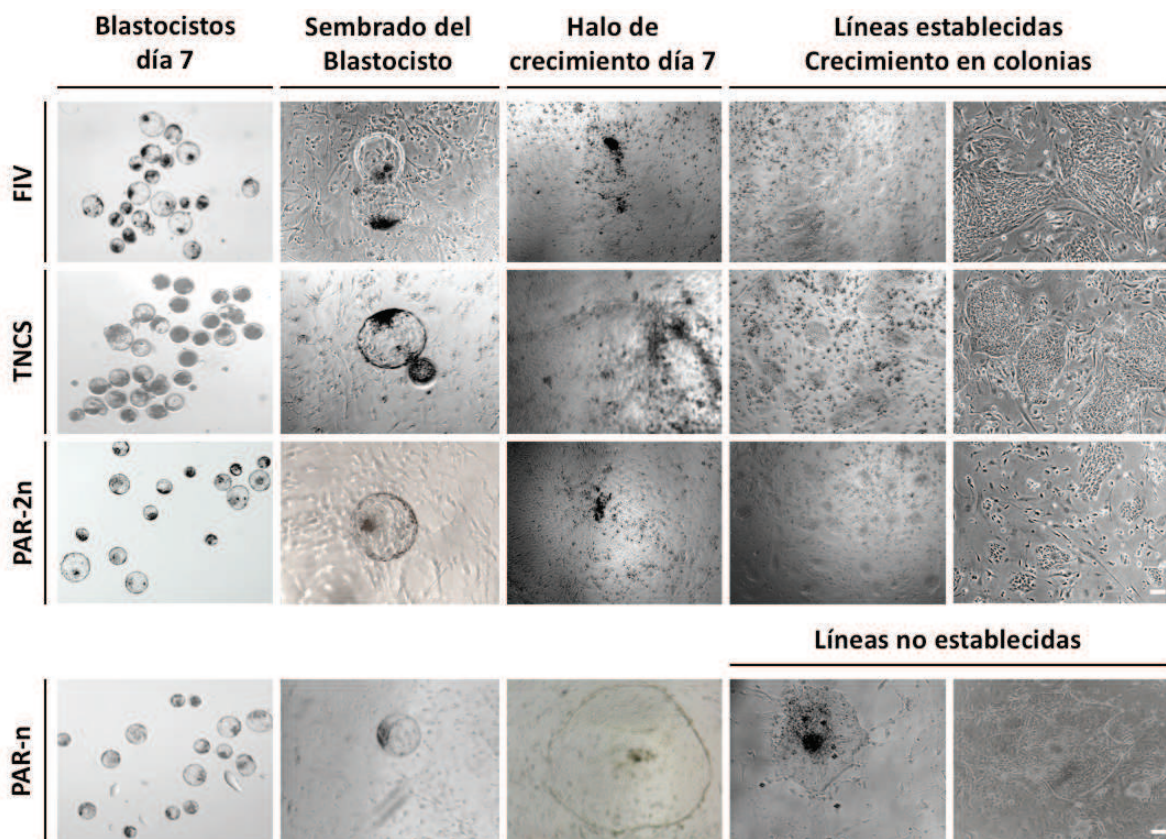
**Tabla III: Eficiencia de derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas a partir de embriones producidos por FIV, TNCS y activación partenogenética.** En la tabla se indica el porcentaje de blastocistos obtenidos por cada técnica (el cual se calculó en base al número de oocitos iniciales), el número de réplicas de cada ensayo, la cantidad de blastocistos adheridos sobre los iMEF, el pasaje en que se establecieron las líneas de CMEB, el sexo de las líneas, y la eficiencia de derivación (porcentaje de líneas establecidas sobre el total de blastocistos adheridos a los iMEF). FIV= fecundación *in vitro*. TNCS= transferencia nuclear de células somáticas. PAR 2n= embriones diploides producidos por activación partenogenética. PAR n= embriones haploides producidos por activación partenogenética. ANOVA, diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) indicadas con letras distintas.

Técnica	% Blastocistos	Réplicas	Blastocistos adheridos a los iMEF	Pasaje de establecimiento	Sexo (#)	Eficiencia de derivación
FIV	55%	8	28	3-4	37,5% ♀ (3/8) 62,5% ♂ (5/8)	29% (8/28) <sup>a</sup>
TNCS	33%	5	31	3-4	100%	29% (9/31) <sup>a</sup>
PAR 2n	45%	6	36	5	100%	5% (2/36) <sup>b</sup>
PAR n	12%	5	26	-	-	-

ANOVA,  $p < 0,05$

Considerando que durante el capítulo 1 no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de establecimiento de las líneas de CMEB derivadas a partir de embriones individuales o de grupos de embriones, en este capítulo las líneas fueron derivadas a partir de embriones individuales para

poder detectar posibles variaciones entre las diferentes líneas celulares. En todos los casos, embriones de día 7-8 de desarrollo sin zona pelúcida o en proceso de eclosión fueron sembrados sobre una monocapa de iMEF y fueron cultivados hasta que se observó la formación de colonias. Luego de 3-4 pasajes, se lograron establecer 9 líneas de CMEB a partir de embriones producidos por TNCS (TNCS-CMEB), lo que representa una eficiencia de derivación del 29% (9/31), similar a la eficiencia de derivación de FIV-CMEB (Tabla III, Figura 29).



**Figura 29:** Derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas a partir de embriones producidos por FIV, TNCS y activación partenogenética. Fotomicrografías en campo claro que muestran las distintas etapas de la derivación de líneas de CMEB a partir de FIV (fecundación *in vitro*), TNCS (transferencia nuclear de células somáticas), PAR-2n (embriones diploides producidos por activación partenogenética) y PAR-n (embriones haploides producidos por activación partenogenética). Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.

Mediante la amplificación del gen *Ddx3x/Ddx3y*, pudimos determinar que todas las líneas TNCS-CMEB eran de sexo masculino, al igual que los fibroblastos empleados como donantes nucleares

durante la TNCS, descartando la posibilidad de que hayan sido embriones derivados de activación partenogenética.

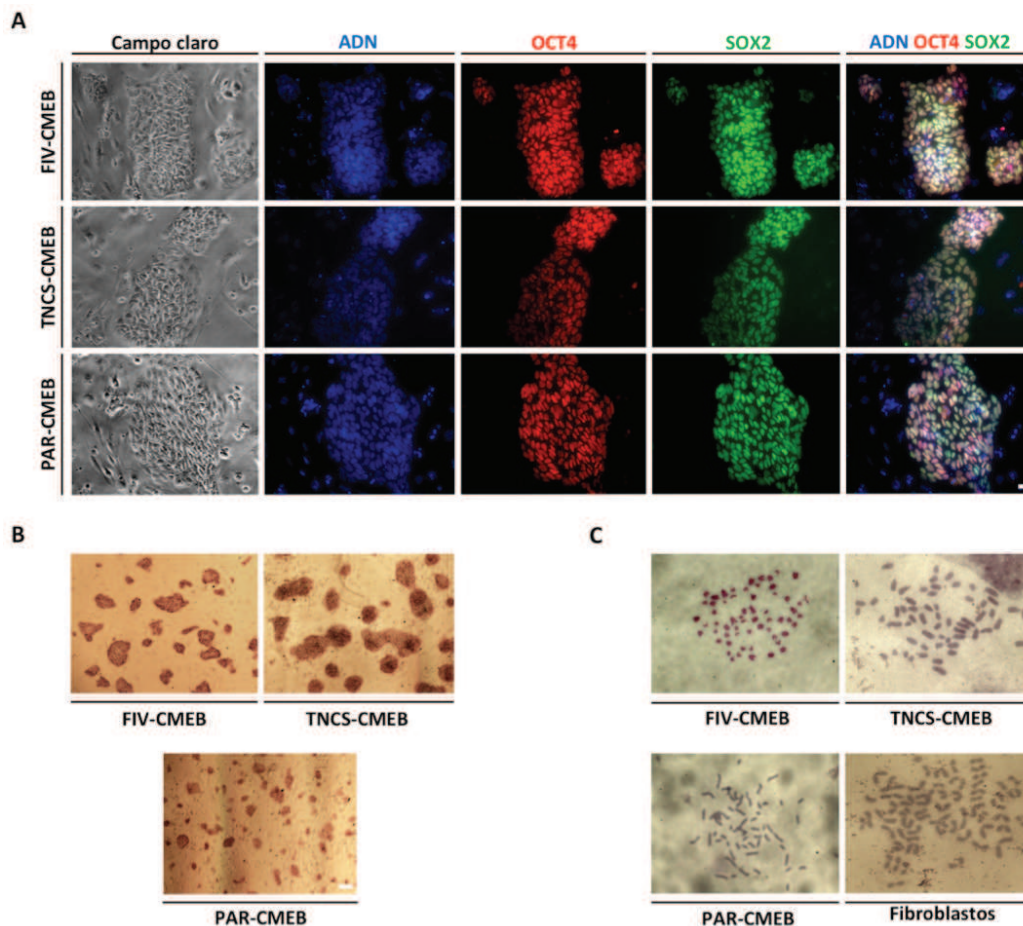
En el caso de la derivación de líneas de CMEB a partir de embriones producidos por activación partenogenética, luego de 5 pasajes logramos obtener dos líneas de CMEB a partir de partenotes diploides (PAR-CMEB), obteniendo una eficiencia del 5% (2/36) (Tabla III, Figura 29). No obstante, sólo fue posible mantener una sola de las líneas más allá del pasaje 6, ya que la otra se diferenció espontáneamente. En el caso de los embriones haploides producidos por activación partenogenética, no fue posible establecer líneas de CMEB a partir de los mismos. Observamos que, en la mayor parte de los casos, las células derivadas del MCI de los embriones diploides o haploides producidos por activación partenogenética dejaban de proliferar luego del segundo o tercer pasaje.

Estos resultados indican que establecer líneas celulares a partir de embriones producidos por activación partenogenética es un proceso inestable e ineficiente; mientras que la derivación de líneas de CMEB a partir de embriones producidos por TNCS o FIV resulta en eficiencias y características similares entre las líneas.

#### **4.2: Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas a partir de distintas fuentes embrionarias. Marcadores de pluripotencia y estabilidad genómica.**

Una vez obtenidas las líneas de CMEB derivadas a partir de las distintas fuentes embrionarias, se llevó a cabo una breve caracterización de las mismas. Se evaluó la morfología de crecimiento, la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2, y el cariotipo. Al igual que las líneas de CMEB obtenidas a partir de embriones producidos por FIV, las líneas de CMEB obtenidas a partir de embriones producidos por TNCS o activación partenogenética podían ser disociadas utilizando un tratamiento enzimático y amplificadas en una relación 1:10 cada 3-4 días, dependiendo de la línea celular. En todos los casos, las células presentaron una morfología de crecimiento en colonias compactas y planas con bordes definidos, con una elevada relación núcleo/citoplasma (Figura 29). Las líneas TNCS-CMEB y PAR-CMEB se mantuvieron estables por más de 15 pasajes en cultivo sin exhibir cambios en su morfología o capacidad proliferativa. Asimismo, mostraron actividad de la enzima

fosfatasa alcalina y una expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 (Figura 30A-B). El análisis del cariotipo reveló que tanto las líneas TNCS-CMEB y PAR-CMEB como los fibroblastos empleados como donantes nucleares durante la técnica de TNCS, poseían un cariotipo normal de 60 cromosomas, característico de la especie bovina (Figura 30C).



**Figura 30:** Caracterización de las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas a partir de distintas fuentes embrionarias. **A.** Detección de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 mediante inmunofluorescencia en las líneas FIV-CMEB, TNCS-CMEB, PAR-CMEB en pasaje 12. Los iMEF fueron usados como control negativo. **B.** Ensayo de fosfatasa alcalina en las líneas FIV-CMEB, TNCS-CMEB, PAR-CMEB en pasaje 11. Los iMEF fueron usados como control negativo. **C.** Análisis del cariotipo de las líneas FIV-CMEB, TNCS-CMEB, PAR-CMEB y los fibroblastos utilizados como donantes nucleares durante la TNCS en pasaje 14. Se contaron en promedio 15 metafases por muestra. La totalidad de las líneas FIV-CMEB, TNCS-CMEB, y PAR-CMEB fueron independientemente caracterizadas por cada ensayo. Escala correspondiente a 100  $\mu$ m.



Concluimos entonces que es posible establecer líneas de células madre embrionarias bovinas a partir de embriones producidos por TNCS y activación partenogenética, las cuales poseen características semejantes a las FIV-CMEB en cuanto a su morfología de crecimiento, expresión de marcadores de pluripotencia y estabilidad genómica.

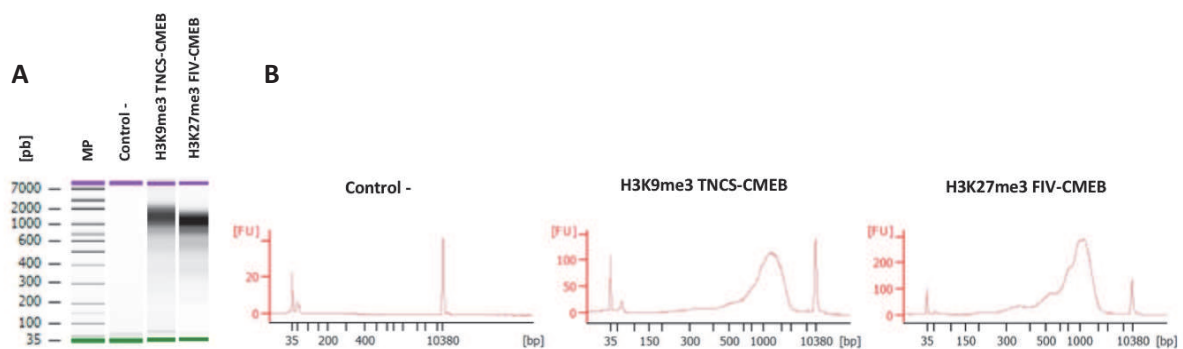
#### **4.3: Perfil de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3.**

Las modificaciones postraduccionales de los extremos N- terminales de las histonas están relacionadas con cambios en la estructura de la cromatina y, por lo tanto, con la regulación de la expresión génica. Varias marcas epigenéticas han sido identificadas como barreras transcripcionales que impiden la correcta reprogramación celular durante la TNCS, entre las cuales se encuentran la H3K4me3, la H3K9me3 y la H3K27me3. La H3K4me3 está generalmente asociada con la activación transcripcional, y suele ser encontrada en promotores y sitios de iniciación transcripcional (TSS, del inglés “*Transcription Starting Site*”). Por el contrario, las marcas H3K27me3 y la H3K9me3 generalmente están asociadas con el silenciamiento transcripcional, y suelen ser encontradas en regiones promotoras de genes involucrados en el desarrollo o en la heterocromatina constitutiva, respectivamente. Debido al rol que estas modificaciones poseen sobre la transcripción celular, decidimos evaluar si existían diferencias en la distribución genómica de estas marcas de histonas entre las líneas de células madre embrionarias derivadas de embriones producidos por las diferentes técnicas reproductivas. Para ello, realizamos la técnica denominada *Cleavage under Targets and Tagmentation (CUT&Tag)* en tres líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por TNCS y FIV, y en los fibroblastos utilizados como donantes nucleares durante la técnica de TNCS. Con el fin de evitar diferencias a nivel del epigenoma y transcriptoma relacionadas con dimorfismos sexuales y con el proceso de inactivación del cromosoma X, las líneas de FIV-CMEB y TNCS-CMEB estudiadas fueron de sexo masculino. Todas las muestras fueron procesadas en simultáneo en el pasaje más bajo posible, para evitar la potencial homogeneización de los cultivos, producto del cultivo prolongado *in vitro*.

La técnica de *CUT&Tag* permite determinar, en un bajo número de células, la distribución en el genoma de los distintos componentes que interactúan con la cromatina, como por ejemplo modificaciones postraduccionales de histonas y factores de transcripción. A diferencia de otras

técnicas empleadas para el estudio de la cromatina como las técnicas denominadas *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq)* o *Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease (CUT&RUN)* esta técnica arroja resultados más específicos, permitiendo confeccionar el perfil de las modificaciones de histonas con una menor profundidad de secuenciación (1.000.000 de lecturas por muestra) <sup>274,275</sup>.

Durante este trabajo, se confeccionaron 24 bibliotecas mediante la técnica de *CUT&Tag*, incluyendo un control negativo para una línea de FIV-CMEB, TNCS-CMEB y los fibroblastos (Tabla XI, sección 6.31). Previo a la secuenciación de las bibliotecas, se corroboró la pureza, los tamaños de los fragmentos y la concentración de las mismas. En la Figura 31 se muestran los perfiles de digestión del ADN obtenidos para algunas bibliotecas, con excepción del control negativo que, como era de esperarse, no exhibió digestión del ADN.



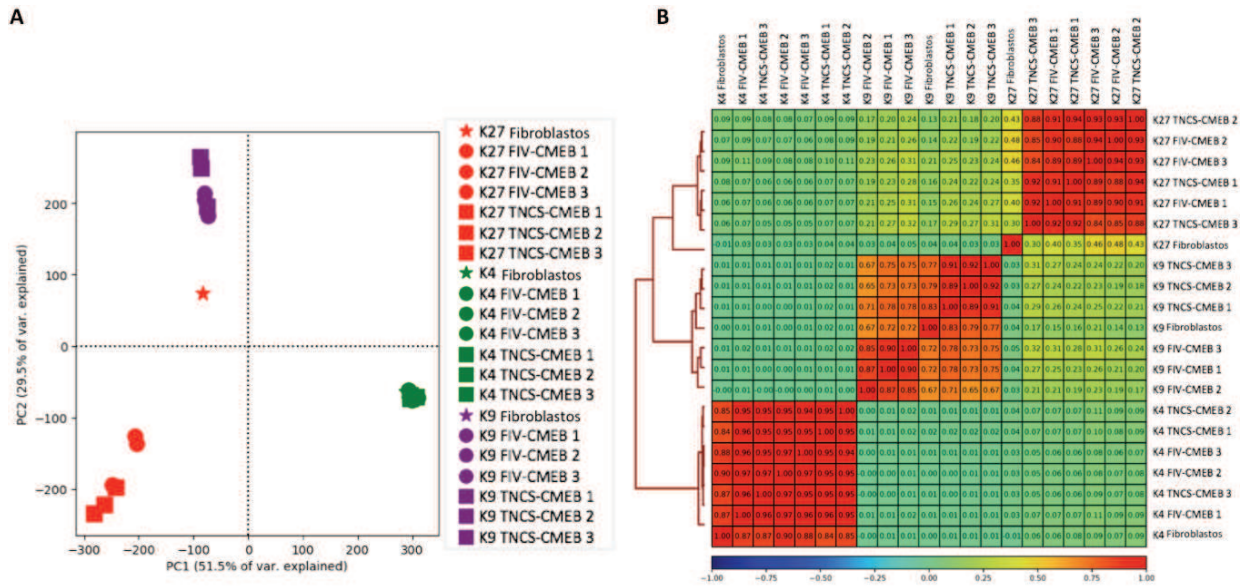
**Figura 31: Bibliotecas producidas por la técnica *CUT&Tag*.** Las imágenes fueron generadas por el equipo de electroforesis automática *Agilent 2100 Expert Bioanalyzer* y se muestra la distribución de los distintos fragmentos de ADN obtenidos para cada biblioteca. **A.** Gel digital resultante de la electroforesis automática. MP= marcador de peso molecular; Control - = control negativo para la muestra de fibroblastos en donde se utilizó IgG en lugar de un anticuerpo específico contra alguna de las modificaciones de histonas estudiadas; H3K9me3 TNCS-CMEB= análisis de la marca H3K9me3 en una línea TNCS-CMEB; H3K27me3 FIV-CMEB= análisis de la marca H3K27me3 en una línea FIV-CMEB. Se puede observar la ausencia de digestión del ADN en el control y la presencia de digestión del ADN en las muestras experimentales. **B.** Electroferogramas de las muestras exhibidas en (A) donde se pueden diferenciar los perfiles de digestión del ADN. Se observa que la mayoría de los fragmentos poseen una longitud entre 500 y 1000 pb. El pico que se observa en el extremo izquierdo y derecho de cada electroferograma son utilizados para alinear a las muestras en el gráfico, y corresponden al marcador de peso molecular de menor y mayor tamaño, respectivamente. El pico consecutivo al pico del extremo izquierdo indica la presencia de oligonucleótidos remanentes luego de la amplificación de los fragmentos por PCR.

Habiendo corroborado la digestión del ADN en las muestras, el siguiente paso consistió en secuenciar las bibliotecas confeccionadas. Luego de la secuenciación y el procesamiento de las lecturas crudas, se obtuvieron un promedio de 10 millones de lecturas totales (Tabla IV).

**Tabla IV: Procesamiento de las lecturas obtenidas por CUT&Tag para cada biblioteca.** En la tabla se pueden observar las marcas analizadas en cada biblioteca, la cantidad de lecturas crudas (lecturas arrojadas por el secuenciador), la cantidad de lecturas crudas alineadas con el genoma de referencia, el porcentaje de lecturas crudas alineadas con el genoma de referencia, la cantidad de duplicados, el porcentaje de duplicados sobre las lecturas alineadas, la cantidad de lecturas de baja calidad, el porcentaje de de-duplicados (secuencias de baja calidad sobre las secuencias alineadas sin duplicados), y la cantidad de lecturas alineadas finales (lecturas alineadas sin las lecturas duplicadas y de baja calidad).

ID	Marca	Lecturas crudas	Lecturas alineadas	% de lecturas crudas alineadas	Duplicados	% de alineamiento	Baja calidad	% de-duplicados	Lecturas finales
Fibroblastos	IgG	1.152.676	1.096.368	95,12%	817.880	74,6%	141.823	50,9%	136.665
FIV-CMEB 3	IgG	135.066	113.000	83,66%	66.273	58,6%	22.251	47,6%	24.476
TNCS-CMEB 2	IgG	390.356	343.792	88,07%	219.156	63,7%	64.238	51,5%	60.398
Fibroblastos	H3K27me3	29.088.870	28.660.480	98,53%	17.716.516	61,8%	1.265.076	11,6%	9.678.888
FIV-CMEB 1	H3K27me3	27.580.280	26.376.354	95,63%	22.628.772	85,8%	1.073.242	28,6%	2.674.340
FIV-CMEB 2	H3K27me3	69.569.788	66.431.469	95,49%	22.036.957	33,2%	5.490.619	12,4%	38.903.893
FIV-CMEB 3	H3K27me3	33.341.018	32.085.934	96,24%	16.180.918	50,4%	4.245.225	26,7%	11.659.791
TNCS-CMEB 1	H3K27me3	59.564.280	56.193.512	94,34%	45.220.058	80,5%	3.209.345	29,2%	7.764.109
TNCS-CMEB 2	H3K27me3	43.030.986	41.474.955	96,38%	15.995.314	38,6%	2.840.860	11,1%	22.638.781
TNCS-CMEB 3	H3K27me3	53.553.156	51.516.173	96,20%	46.546.412	90,4%	1.822.745	36,7%	3.147.016
Fibroblastos	H3K4me3	31.664.296	31.015.346	97,95%	25.065.527	80,8%	324.384	5,5%	5.625.435
FIV-CMEB 1	H3K4me3	26.364.872	25.753.731	97,68%	20.475.011	79,5%	2.043.403	38,7%	3.235.317
FIV-CMEB 2	H3K4me3	60.732.992	59.191.374	97,46%	29.800.877	50,3%	3.378.463	11,5%	26.012.034
FIV-CMEB 3	H3K4me3	24.323.860	23.754.955	97,66%	18.892.848	79,5%	1.650.683	33,9%	3.211.424
TNCS-CMEB 1	H3K4me3	23.987.594	23.386.226	97,49%	18.915.395	80,9%	1.851.122	41,4%	2.619.709
TNCS-CMEB 2	H3K4me3	17.290.800	16.916.450	97,83%	14.184.783	83,9%	1.166.163	42,7%	1.565.504
TNCS-CMEB 3	H3K4me3	92.012.670	90.008.522	97,82%	26.868.198	29,9%	6.482.056	10,3%	56.658.268
Fibroblastos	H3K9me3	22.410.626	21.774.081	97,16%	5.886.660	27,0%	11.426.246	71,9%	4.461.175
FIV-CMEB 1	H3K9me3	25.808.564	25.145.928	97,43%	10.850.483	43,2%	10.209.046	71,4%	4.086.399
FIV-CMEB 2	H3K9me3	67.979.678	66.074.076	97,20%	19.446.049	29,4%	28.244.071	60,6%	18.383.956
FIV-CMEB 3	H3K9me3	26.673.270	25.935.651	97,23%	8.762.706	33,8%	10.830.597	63,1%	6.342.348
TNCS-CMEB 1	H3K9me3	37.819.872	36.569.942	96,70%	21.911.278	59,9%	11.078.391	75,6%	3.580.273
TNCS-CMEB 2	H3K9me3	35.982.354	35.037.374	97,37%	25.062.219	71,5%	8.791.128	88,1%	1.184.027
TNCS-CMEB 3	H3K9me3	51.463.912	50.018.523	97,19%	34.459.093	68,9%	13.728.316	88,2%	1.831.114
	Promedio	35.913.410	34.786.426	95,99%	19.500.391	60,7%	5.474.146	42,1%	9.811.889
	Total	861.921.836	834.874.216		468.009.383		131.379.493		235.485.340

Mediante el análisis de componentes principales y la matriz de correlación, observamos que la marca H3K4me3 era la menos variable entre las fuentes celulares analizadas; la marca H3K27me3 difería entre las células somáticas y las células madre embrionarias bovinas; y la marca H3K9me3 fue la que presentó mayor variabilidad entre las líneas de FIV-CMEB y TNCS-CMEB, ubicándose las TNCS-CMEB más cerca de los fibroblastos (Figura 32A-B).

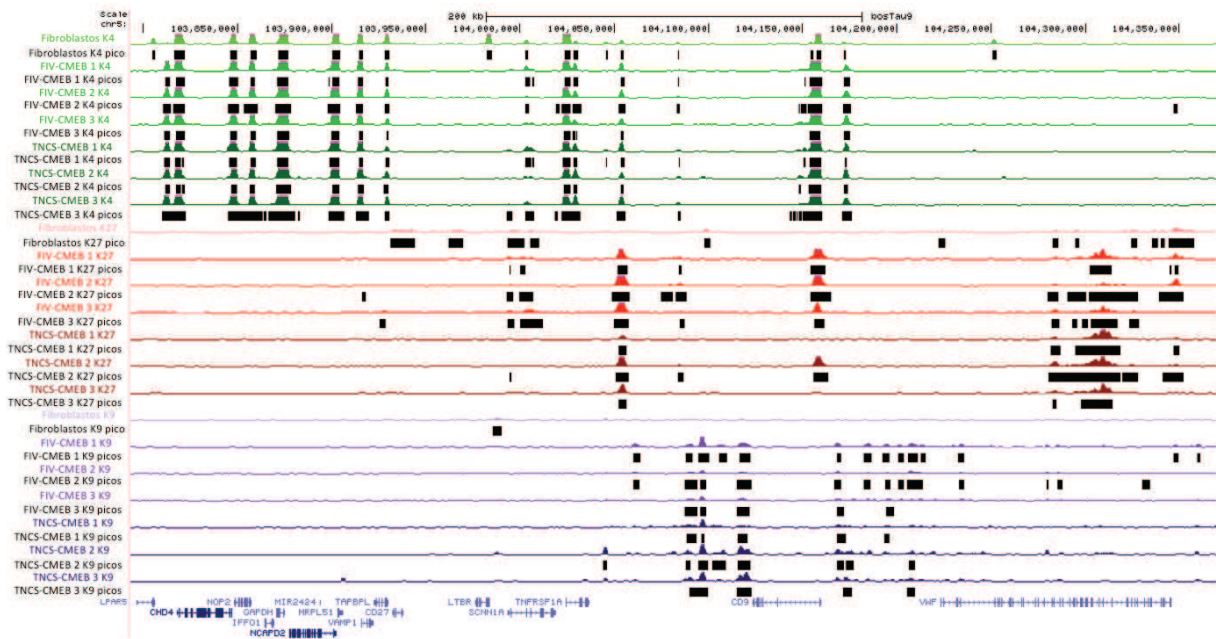


**Figura 32:** Distribución global de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 en FIV-CMEB, TNCS-CMEB y fibroblastos. **A.** Análisis de componentes principales de las 100.000 regiones con mayor señal en cuentas por millón (CPM), normalizada por la varianza, para todas las marcas analizadas en todos los tipos celulares de estudio. **B.** Heat map de las 100.000 regiones con mayor señal en CPM, normalizada por la varianza, para todas las marcas analizadas en todos los tipos celulares. La matriz de correlación fue agrupada según la señal normalizada a lo largo del genoma utilizando la correlación de Pearson.

A continuación, para identificar regiones que tuvieran una señal diferencial de las marcas de histonas analizadas entre las FIV-CMEB y TNCS-CMEB, se determinaron las regiones de enriquecimiento o picos de llamada máxima (del inglés “*peaks calls*”). Estas regiones de enriquecimiento fueron determinadas para cada biblioteca (Tabla V, columna picos por biblioteca); para cada fuente embrionaria en donde las tres líneas de cada fuente embrionaria fueron combinadas para una marca de histona determinada (Tabla V, columna picos por fuente embrionaria); y para cada marca de histona en donde todas las bibliotecas fueron combinadas independientemente de la fuente embrionaria (Tabla V, columna picos por marca). Luego, los picos resultantes fueron combinados con el fin de crear un único conjunto de picos para cada modificación de histona que abarcara todas las regiones de enriquecimiento detectadas en todas las líneas celulares analizadas (Tabla V, columna picos combinados; Figura 33).

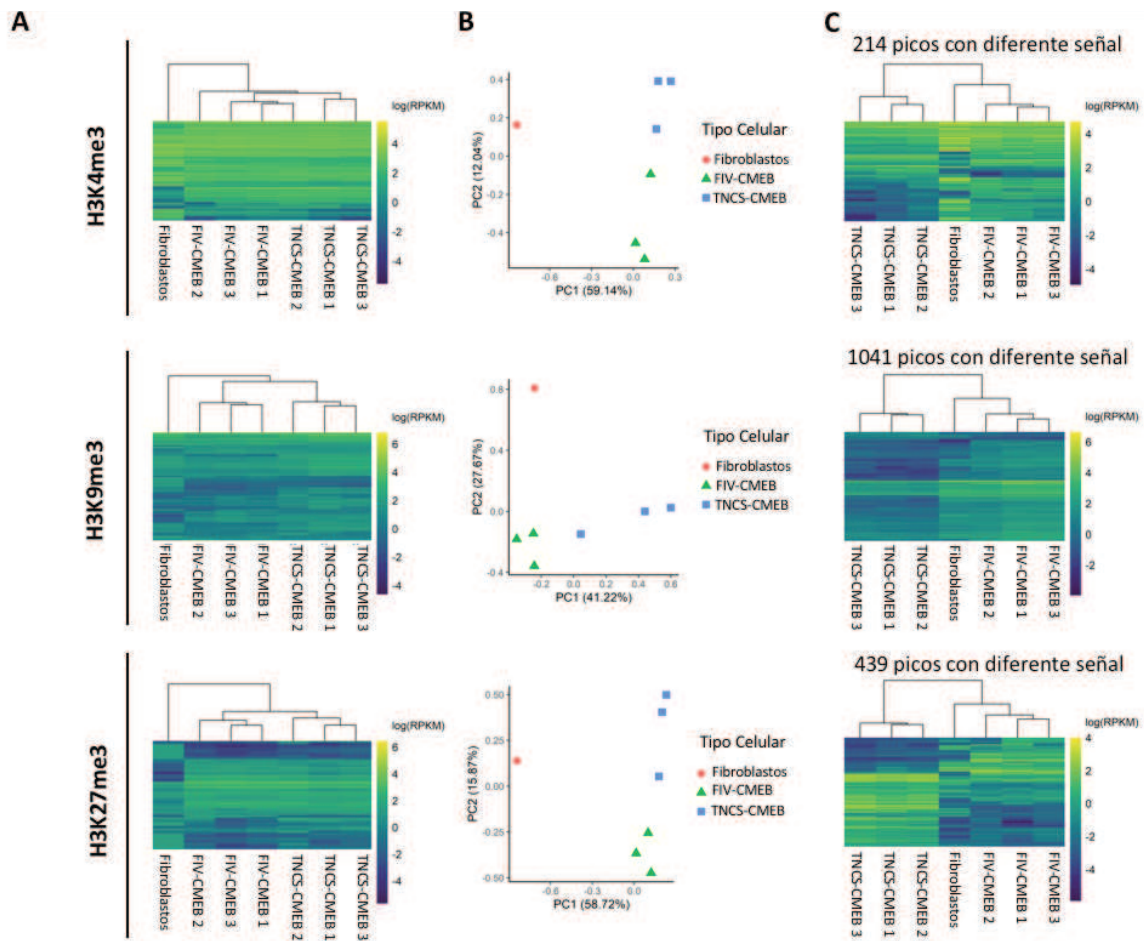
**Tabla V:** Cantidad de regiones de enriquecimiento para cada biblioteca, cada fuente embrionaria, cada marca de histona, y para los picos combinados resultantes del agrupamiento de los grupos anteriores.

Marca	Tipo celular	Replicado	Picos por biblioteca	Picos por fuente embrionaria	Picos por marca	Picos combinados
H3K27me3	Fibroblastos	1	35.762	35.762		
H3K27me3	FIV-CMEB	1	11.410			
H3K27me3	FIV-CMEB	2	17.481	18.656		
H3K27me3	FIV-CMEB	3	16.929		22.483	43.239
H3K27me3	TNCS-CMEB	1	8.716			
H3K27me3	TNCS-CMEB	2	15.183	11.789		
H3K27me3	TNCS-CMEB	3	11.041			
H3K4me3	Fibroblastos	1	16.488	16.488		
H3K4me3	FIV-CMEB	1	16.908			
H3K4me3	FIV-CMEB	2	17.937	19.338		
H3K4me3	FIV-CMEB	3	16.645		22.336	23.761
H3K4me3	TNCS-CMEB	1	16.526			
H3K4me3	TNCS-CMEB	2	15.946	21.385		
H3K4me3	TNCS-CMEB	3	21.590			
H3K9me3	Fibroblastos	1	24.444	24.444		
H3K9me3	FIV-CMEB	1	31.103			
H3K9me3	FIV-CMEB	2	39.701	39.581		
H3K9me3	FIV-CMEB	3	21.622		39.526	53.839
H3K9me3	TNCS-CMEB	1	25.314			
H3K9me3	TNCS-CMEB	2	13.578	23.248		
H3K9me3	TNCS-CMEB	3	14.137			



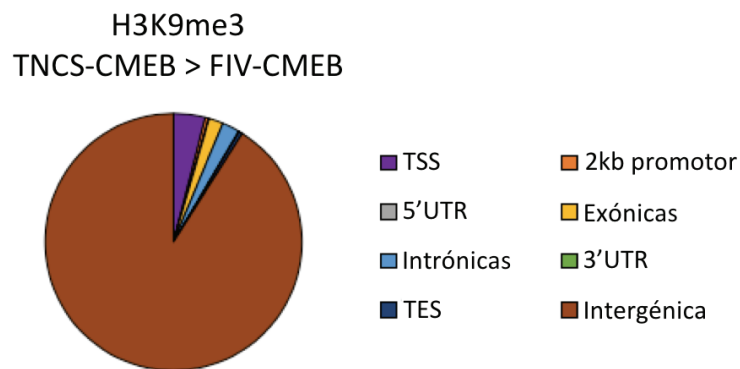
**Figura 33:** Regiones de enriquecimiento para cada biblioteca. La imagen es una captura de la plataforma de análisis del genoma en donde se visualiza una región genómica que posee señal de las tres marcas de histonas analizadas (H3K4me3 en verde, H3K27me3 en rojo, H3K9me3 en violeta) junto con los picos de llamada máxima para cada biblioteca (en negro).

A partir del conjunto de picos combinados, cuantificamos 439 regiones que poseían una señal diferencial de la marca H3K27me3, 214 con señal diferencial de la marca H3K4me3, y 1.041 con señal diferencial de la marca H3K9me3 entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB, siendo esta última la marca que mostró ser la más variable entre las células madre embrionarias bovinas derivadas de distintas fuentes embrionarias (Figura 34).



**Figura 34:** Identificación de las regiones con señal diferencial de las marcas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB. **A.** Heat map de los picos combinados para cada marca de histona y cada biblioteca, mostrando la expresión de las 5.000 regiones con mayor señal en RPKM (del inglés “Reads Per Kilo base per Million”), normalizada por la varianza. **B.** Análisis de componentes principales de la expresión de las 5.000 regiones con mayor señal en RPKM, normalizada por la varianza. **C.** Heat map de los picos normalizados con diferente señal (en RPKM) entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB ( $p < 0,01$ ).

Finalmente, estudiamos si las regiones genómicas con diferente señal de las marcas de histonas se encontraban enriquecidas por algún motivo de secuencia. Observamos que las regiones con mayor señal de H3K9me3 en las TNCS-CMEB ocupaban regiones intergénicas y estaban significativamente enriquecidas con motivos *E-box* (73% de las regiones), *Gata3* (62% de las regiones) y *p53* (61% de las regiones) (Figura 35, Tabla VI). Por el contrario, no hallamos motivos de enriquecimiento para las regiones genómicas con señal diferencial de H3K9me3 en las FIV-CMEB, ni para las regiones con señal diferencial de H3K4me3 y H3K27me3 en las células madre embrionarias bovinas derivadas de ambas fuentes embrionarias (Tabla VI).



**Figura 35:** Características genómicas de las regiones con mayor señal de la marca H3K9me3 en las líneas TNCS-CMEB comparado con las líneas FIV-CMEB.

**Tabla VI: Análisis de los motivos de secuencia de las regiones con señal diferencial de las marcas de histonas entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB.** Para cada región con señal diferencial de las marcas de histonas entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB se muestran: los cinco motivos de secuencia principales, el porcentaje de regiones que abarcaba cada motivo, y el porcentaje de regiones asignadas de forma aleatoria por cada motivo.

		Regiones con mayor señal en TNCS-CMEB					Regiones con mayor señal en FIV-CMEB				
		Motivo	Valor p	Benjamini	Regiones	Aleatorias	Motivo	Valor p	Benjamini	Regiones	Aleatorias
H3K9me3		E-box (bHLH)	1,00E-165	0,00E+00	73,29%	30,03%	RAR:RXR (NR), DR5	1,00E+00	1,00E+00	28,24%	23,01%
		GATA3 (Zf), DR8	1,00E-72	0,00E+00	62,46%	33,60%	ZNF41 (Zf)	1,00E+00	1,00E+00	27,06%	23,86%
		p53 (p53)	1,00E-70	0,00E+00	60,99%	32,64%	REST-NRSF (Zf)	1,00E+00	1,00E+00	7,06%	5,60%
		CRE (bZIP)	1,00E-48	0,00E+00	78,86%	56,18%	GFY-Staf (?,Zf)	1,00E+00	1,00E+00	38,82%	37,51%
		NRF1 (NRF)	1,00E-27	0,00E+00	31,18%	17,22%	Unknown2	1,00E+00	1,00E+00	3,53%	3,09%
H3K4me3		DPL-1 (E2F)	1,00E-01	1,00E+00	70,00%	55,13%	DPL-1 (E2F)	1,00E-05	3,30E-03	77,59%	62,02%
		T1ISRE (IRF)	1,00E-01	1,00E+00	7,50%	2,07%	SeqBias: CG-repeat	1,00E-04	3,80E-03	89,08%	76,55%
		ETS (ETS)	1,00E-01	1,00E+00	55,00%	41,62%	NRF1 (NRF)	1,00E-03	2,67E-02	29,31%	18,10%
		GFX (?)	1,00E-01	1,00E+00	5,00%	1,11%	TATA-box	1,00E-02	3,76E-01	18,97%	11,77%
		NFkB-p65-Rel (RHD)	1,00E-01	1,00E+00	27,50%	17,51%	T1ISRE (IRF)	1,00E-02	5,29E-01	5,75%	2,27%
H3K27me3		GFX (?)	1,00E+00	1,00E+00	1,72%	1,42%	ZNF382 (Zf)	1,00E+00	1,00E+00	26,21%	22,17%
		REST-NRSF (Zf)	1,00E+00	1,00E+00	4,14%	3,74%	OCT:OCT (POU,Homeobox,IR1)	1,00E+00	1,00E+00	21,38%	18,39%
		p53 (p53)	1,00E+00	1,00E+00	6,21%	6,32%	EFL-1 (E2F)	1,00E+00	1,00E+00	10,34%	8,38%
		EFL-1 (E2F)	1,00E+00	1,00E+00	6,55%	6,96%	RAR:RXR (NR), DR5	1,00E+00	1,00E+00	22,07%	19,49%
		Unknown2	1,00E+00	1,00E+00	2,07%	2,27%	p53 (p53)	1,00E+00	1,00E+00	9,66%	8,06%

Teniendo en cuenta estos resultados, observamos que la mayor diferencia epigenética entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB es producto de la deposición de la marca H3K9me3 en regiones intergénicas enriquecidas por los motivos de secuencia *E-box*, *Gata3* y *p53*.

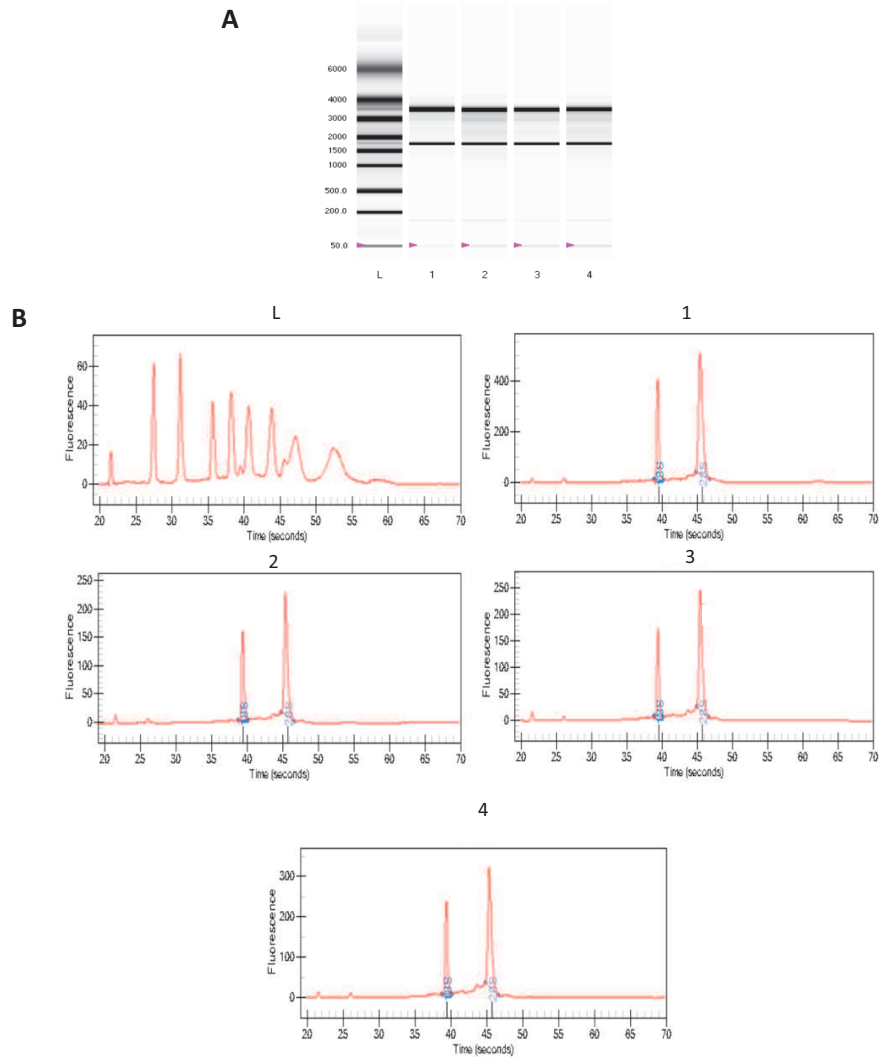
#### 4.4: Estudio del transcriptoma de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS.

Para evaluar si el perfil de expresión de las células madre embrionarias bovinas variaba dependiendo de la fuente embrionaria utilizada durante su derivación, a continuación se realizó una secuenciación masiva del transcriptoma utilizando la técnica de *3'-Tag-RNA-Sequencing* (*3'-Tag-RNA-Seq*) en las tres líneas TNCS-CMEB y FIV-CMEB utilizadas previamente en el estudio del epigenoma, en tres líneas de fibroblastos en donde se incluyó a los fibroblastos utilizados como donantes nucleares durante la técnica de TNCS, y en la línea de CMEB obtenida a partir de embriones diploides producidos por activación partenogenética.

Para el estudio masivo del transcriptoma, el primer paso consistió en extraer el ARN total de las muestras y determinar mediante un sistema de electroforesis automática la concentración, pureza



e integridad del mismo. En la Figura 36 se puede observar la calidad del ARN obtenido para algunas de las muestras, visualizando la presencia de únicamente dos picos, correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, y la ausencia de degradación.



**Figura 36: Integridad y pureza del ARN extraído.** Las imágenes fueron generadas por el equipo de electroforesis automática *Bio-Rad Experion™ Automated Electrophoresis System* en donde se muestran los ARN ribosomales 28S y 18S. **A.** Gel digital resultante de la electroforesis automática donde la calle “L” corresponde al marcador de peso molecular y las calles “1-4” corresponden a algunas de las muestras experimentales, visualizándose los ARN ribosomales 28S y 18S. **B.** Electroferogramas de las muestras exhibidas en (A) donde se pueden diferenciar nítidamente los picos correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, evidenciándose la ausencia de degradación. El pico inferior que se observa en el extremo izquierdo de cada electroferograma corresponde al marcador de peso molecular de menor tamaño el cual es utilizado para alinear a las muestras en el gráfico.

Una vez obtenido el ARN y habiendo corroborado su calidad, el mismo fue utilizado para elaborar bibliotecas de cada una de las líneas a ser secuenciadas. Estos procedimientos fueron llevados a cabo por el centro de secuenciación *DNA Technologies and Expression Analysis Core, UC Davis Genome Center, USA*. Luego de la secuenciación, aproximadamente un 96% de las lecturas crudas alineaban con el genoma ensamblado de referencia *ARS-UCD1.2*. Posteriormente, se eliminaron duplicados (generados durante la amplificación/PCR de las muestras), alineamientos múltiples (lecturas que alineaban con más de un sitio en el genoma de referencia) y alineamientos de baja calidad (con un valor  $q < 5$ , siendo un valor menor a 5 indicativo de lecturas que mapean con la misma probabilidad en múltiples sitios del genoma o lecturas con un bajo número de apareamientos con el genoma de referencia), resultando en aproximadamente 2-3 millones de alineaciones utilizables de cada biblioteca (Tabla VII).

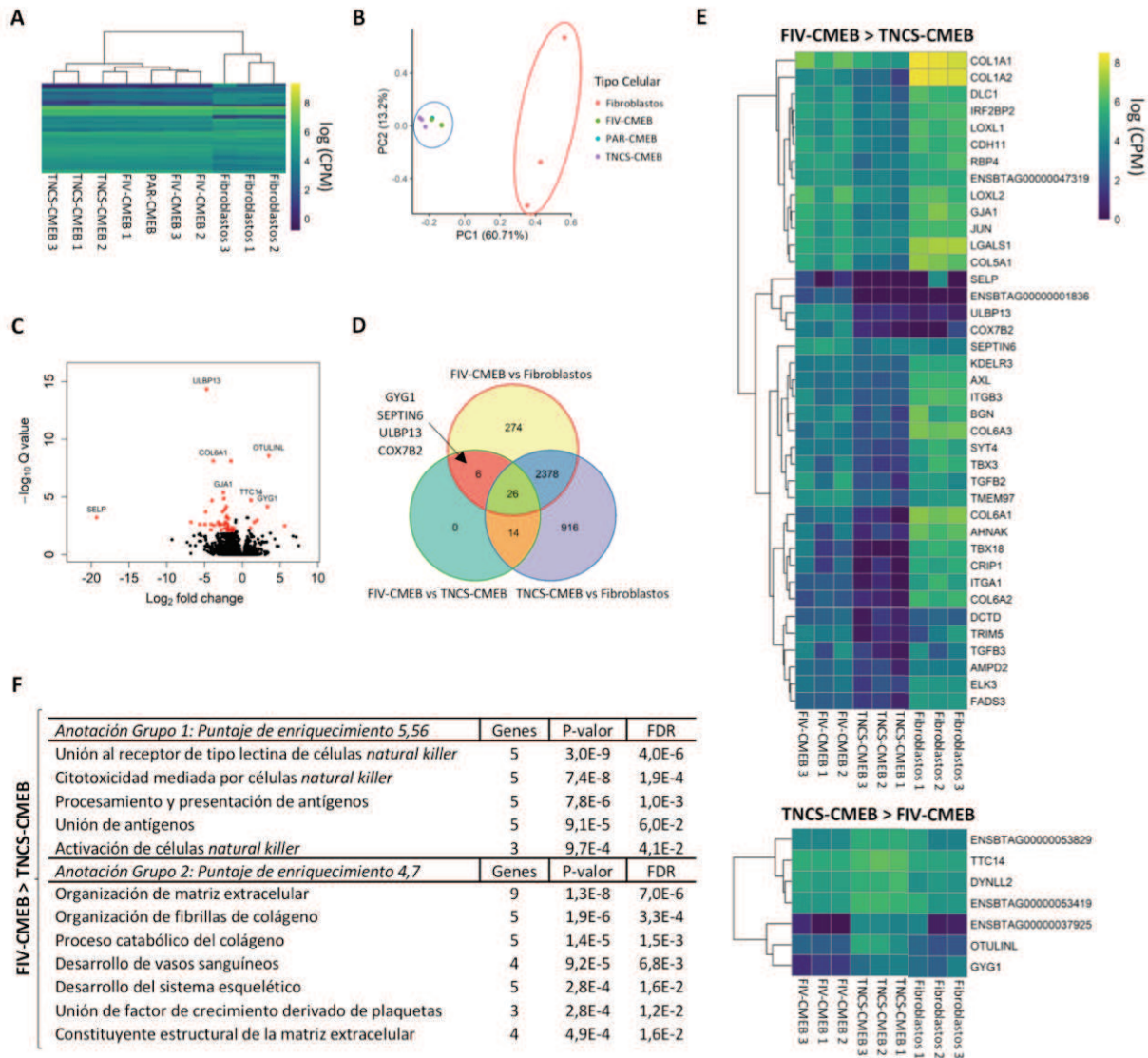
**Tabla VII: Procesamiento de las lecturas obtenidas por la técnica 3'-Tag-RNA-Seq para cada biblioteca.**

En la tabla se pueden observar la cantidad de lecturas crudas (lecturas arrojadas por el secuenciador), la cantidad de lecturas crudas alineadas con el genoma de referencia, el porcentaje de lecturas crudas alineadas con el genoma de referencia, la cantidad de duplicados, el porcentaje de duplicados sobre las lecturas alineadas, la cantidad de lecturas de baja calidad, el porcentaje de de-duplicados (secuencias de baja calidad sobre las secuencias alineadas sin duplicados), y la cantidad de lecturas alineadas finales (lecturas alineadas sin lecturas duplicadas y de baja calidad).

Librería ID	Lecturas crudas	Lecturas alineadas	(% lecturas crudas alineadas)	Duplicados	(% lecturas alineadas)	Baja calidad	(% de-duplicados)	Lecturas finales
PAR-CMEB	8.918.342	8.565.822	96%	4.796.391	56%	460.465	12%	3.308.966
TNCS-CMEB 1	5.954.151	5.703.432	96%	2.880.348	51%	357.508	13%	2.465.576
TNCS-CMEB 2	6.966.889	6.692.474	96%	3.485.628	52%	402.161	13%	2.804.685
TNCS-CMEB 3	6.858.682	6.584.867	96%	3.542.713	54%	391.367	13%	2.650.787
FIV-CMEB 1	6.613.431	6.356.627	96%	3.303.167	52%	368.904	12%	2.684.556
FIV-CMEB 2	9.681.974	9.237.098	95%	5.633.121	61%	427.618	12%	3.176.359
FIV-CMEB 3	6.706.385	6.428.267	96%	3.249.991	51%	382.846	12%	2.795.430
Fibroblastos 1	7.707.885	7.419.926	96%	4.457.555	60%	336.119	11%	2.626.252
Fibroblastos 2	7.959.345	7.709.724	97%	4.421.962	57%	353.006	11%	2.934.756
Fibroblastos 3	8.382.663	8.069.902	96%	5.116.556	63%	328.046	11%	2.625.300
Total	75.749.747	72.768.139	96%	40.887.432	56%	3.808.040	12%	28.072.667

Dado que la técnica de 3'-Tag-RNA-Seq detecta los extremos 3' de los genes y que una inexacta anotación de los mismos podría disminuir la cantidad de alineamientos atribuidos a genes, decidimos extender los extremos 3' UTR (del inglés “*UnTranslated Region*”) de los genes anotados (Ensembl v99) a 1000 pb con el fin de capturar la expresión génica de forma más precisa. La extensión a 1000 pb tomó como referencia la longitud promedio de los extremos 3' UTR de la especie humana la cual es de 800 pb <sup>276</sup>.

Luego de extender los extremos 3' UTR, el 65% de las alineaciones fueron asignadas a genes, lo que nos permitió detectar la transcripción de 11.601 genes codificantes (CPM en todas las muestras > 20). Mediante el análisis de componentes principales, se identificaron dos grupos bien definidos correspondientes a (1) las células madre embrionarias bovinas derivadas de todas las fuentes embrionarias, y (2) a los fibroblastos (Figura 37A-B). Similarmente, el análisis de genes diferencialmente expresados demostró que las FIV-CMEB y TNCS-CMEB poseían transcriptomas semejantes. Un total de 2.378 genes diferencialmente expresados fueron encontrados entre ambas fuentes de células madre embrionarias bovinas y los fibroblastos (valor  $p$  corregido <0,01;  $\log_2 FC > 1$ ); mientras que solo 46 genes diferencialmente expresados (~1%) fueron detectados entre las FIV-CMEB y TNCS-CMEB (Figura 37C-D). De los 46 genes diferencialmente expresados, 39 poseían una expresión más alta en las FIV-CMEB y estaban vinculados con la modulación del sistema inmune y con la organización de la matriz extracelular. Por el otro lado, los 7 genes diferencialmente expresados restantes poseían una mayor expresión en las TNCS-CMEB y no revelaron un enriquecimiento funcional, posiblemente por el bajo número de genes obtenido (Figura 37E-F).



**Figura 37:** Comparación del transcriptoma de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de las distintas fuentes embrionarias y los fibroblastos. **A.** Heat map de los 5000 genes más expresados en CPM, normalizados por la varianza, para las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas de embriones producidos por FIV, TNCS o activación partenogenética (FIV-CMEB, TNCS-CMEB, PAR-CMEB, respectivamente) y fibroblastos. **B.** Análisis de componentes principales de los 5000 genes más expresados en CPM, normalizados por la varianza para las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas de embriones producidos por FIV, TNCS o activación partenogenética (FIV-CMEB, TNCS-CMEB, PAR-CMEB, respectivamente) y fibroblastos. **C.** Diagrama de volcán que muestra el total de genes codificantes (color negro) y los genes diferencialmente expresados (color rojo) entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB. **D.** Diagrama de Ven de los grupos de genes diferencialmente expresados obtenidos por comparación por pares entre las líneas FIV-CMEB y fibroblastos, FIV-CMEB y TNCS-CMEB, y

TNCS-CMEB y fibroblastos. **E.** *Heat maps* de los genes diferencialmente expresados entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB. En el panel superior se encuentran los genes diferencialmente expresados con mayor expresión en las líneas FIV-CMEB en comparación a las líneas TNCS-CMEB. En el panel inferior se encuentran los genes diferencialmente expresados con mayor expresión en las líneas TNCS-CMEB en comparación a las líneas FIV-CMEB. **F.** Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados con mayor expresión en las líneas FIV-CMEB en comparación a las líneas TNCS-CMEB. Los datos de *3'-Tag-RNA-Seq* fueron obtenidos a partir de tres líneas independientes de FIV-CMEB, TNCS-CMEB y fibroblastos; y la línea de PAR-CMEB.

Estos resultados demuestran que las células madre embrionarias bovinas conservan un transcriptoma muy similar, independientemente de la fuente embrionaria de la cual son derivadas, y que, a su vez, éste difiere significativamente del transcriptoma de las células somáticas.

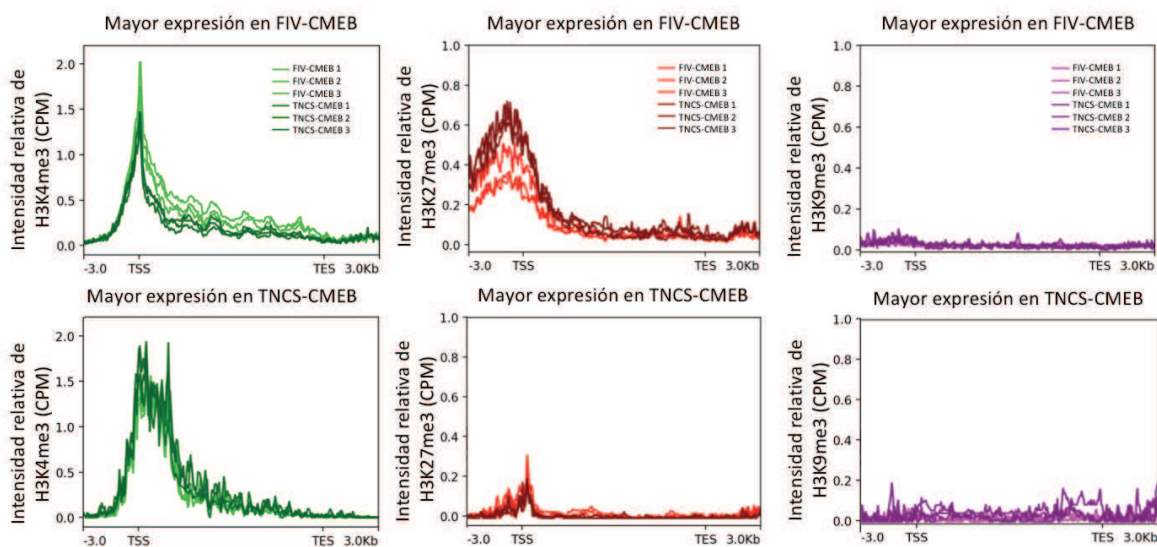
### **4.5: Asociación entre el transcriptoma y el epigenoma de las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS.**

Mediante el análisis del transcriptoma y epigenoma, detectamos la presencia de 46 genes diferencialmente expresados y que la marca H3K9me3 fue la que presentó mayores variaciones entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB. Para continuar investigando la relación entre el transcriptoma y el epigenoma, analizamos si la distribución diferencial de las distintas marcas de histonas podría estar modificando la expresión génica. Para ello, comenzamos por estudiar la presencia e intensidad de las distintas marcas de histonas en los genes diferencialmente expresados que fueron detectados. Observamos que 10 de los 39 genes diferencialmente expresados con mayor expresión en las líneas FIV-CMEB estaban cubiertos por la marca H3K4me3, mientras que las líneas TNCS-CMEB carecían de esta marca de histona en esa región. Una menor proporción de los genes diferencialmente expresados mostraron la presencia de la marca H3K4me3 o de regiones bivalentes (H3K4me3 y H3K27me3) en ambas fuentes de CMEB, aunque con una intensidad más alta en una fuente celular en comparación a la otra. Finalmente, la minoría de los genes diferencialmente expresados diferían en la marca H3K9me3 o no mostraron enriquecimiento para ninguna de las tres marcas analizadas (Tabla VIII). De hecho, al analizar la intensidad relativa de cada marca de histona en los genes diferencialmente expresados y en regiones proximales a éstos

entre las FIV-CMEB y TNCS-CMEB, no observamos una asociación predominante entre estos genes y las marcas de histonas analizadas (Figura 38).

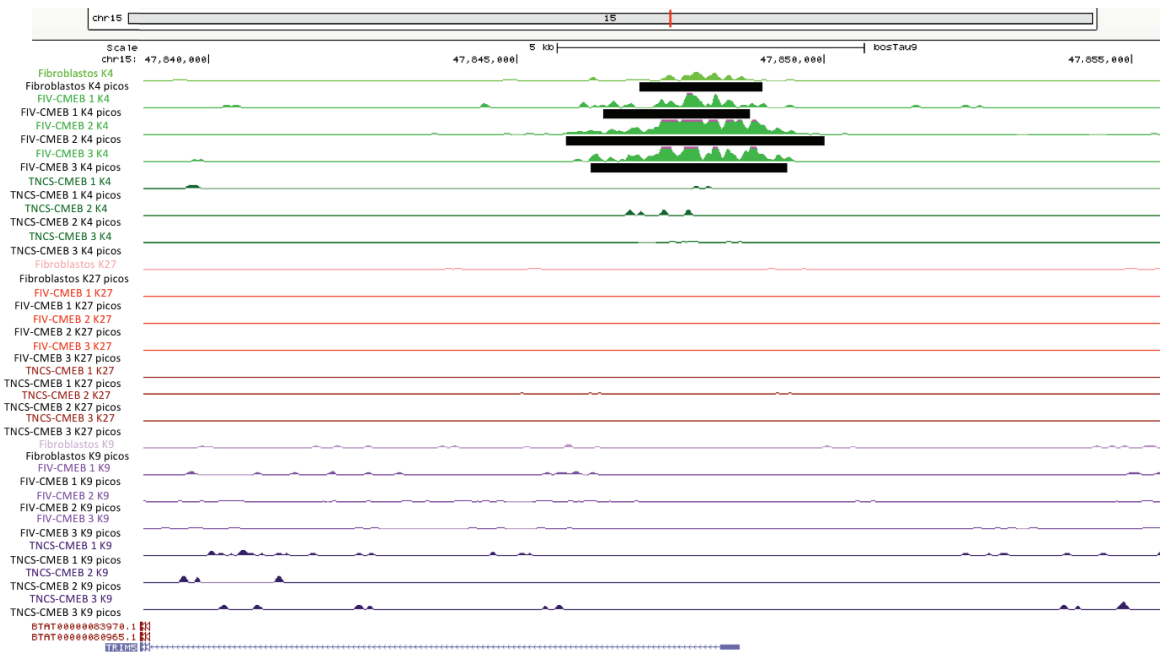
**Tabla VIII: Genes diferencialmente expresados localizados hasta a 50kb de la región con señal diferencial de la marca de histonas entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB.** En la tabla se indican la cantidad de genes diferencialmente expresados con mayor expresión en FIV-CMEB o TNCS-CMEB junto con la señal de la marca de histona predominante en esas regiones.

Genes diferencialmente expresados	Genes	Mayor señal en FIV-CMEB			Mayor señal en TNCS-CMEB		
		H3K4me3	H3K9me3	H3K27me3	H3K4me3	H3K9me3	H3K27me3
Mayor expresión en FIV-CMEB	39	10	0	0	0	1	1
Mayor expresión en TNCS-CMEB	7	0	0	0	1	1	0



**Figura 38: Promedio de la señal de H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3 en genes diferencialmente expresados entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB.** En la figura se muestra la intensidad relativa en CPM de cada marca de histona analizada en las regiones donde se encuentran los genes diferencialmente expresados que poseen mayor expresión en las líneas FIV-CMEB (paneles superiores) o TNCS-CMEB (paneles inferiores) para cada réplica analizada. La longitud del gen fue escalada a 10 kb, y se muestran las regiones de 3 kb hacia arriba y hacia abajo del sitio de comienzo (TSS) y finalización de la transcripción (TES, del inglés “*Transcription Ending Site*”). Se utilizó un tamaño de 250 pb para representar la señal.

Curiosamente, en algunos casos, cuando los genes diferencialmente expresados presentaban un enriquecimiento de la marca H3K4me3 en las líneas FIV-CMEB, este mismo enriquecimiento era observado en las células somáticas y no en las líneas TNCS-CMEB (Figura 39).

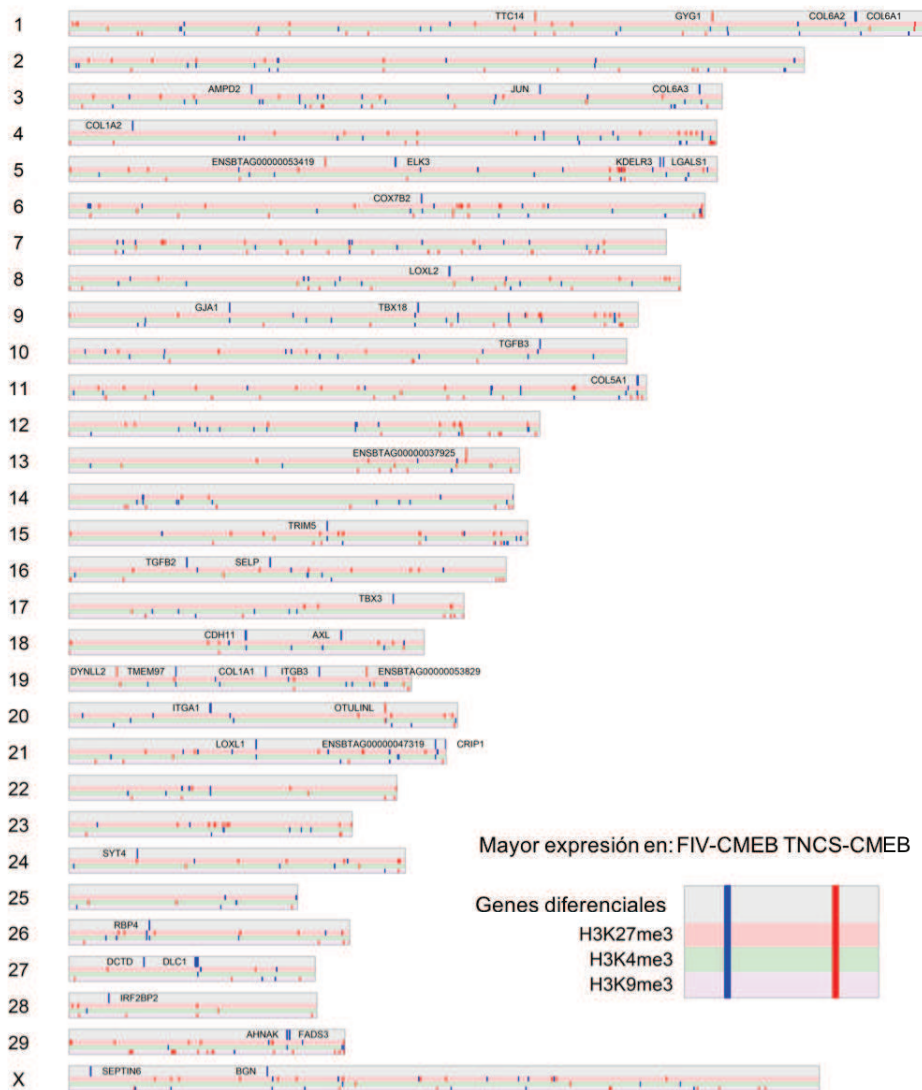


**Figura 39:** Señal de las marcas de histonas en un gen diferencialmente expresado entre las líneas FIV-CMEB, TNCS-CMEB y fibroblastos. La imagen es una captura de la plataforma de análisis del genoma en donde se visualiza una región representativa de un gen diferencialmente expresado (*Trim5*) y la señal diferencial de la marca de histona H3K4me3 (en verde) entre las líneas FIV-CMEB, TNCS-CMEB y los fibroblastos.

Este resultado nos indicó que la ausencia de la marca H3K4me3 en los genes diferencialmente expresados en las líneas TNCS-CMEB no sería producto de una memoria epigenética heredada por la incompleta reprogramación de la célula donante ya que las células somáticas mostraron enriquecimiento de esta marca en los genes diferencialmente expresados, al igual que las líneas FIV-CMEB.

Dado que la expresión génica podría estar regulada por la presencia de modificaciones postraduccionales de histonas en regiones proximales al cuerpo del gen, continuamos por investigar la localización de las regiones con señal diferencial de las marcas de histonas en todo el genoma. Estudiando la distribución de los genes diferencialmente expresados y de las regiones con señal diferencial de las marcas de histonas, pudimos observar que estas regiones se

encontraban distribuidas uniformemente entre todos los cromosomas bovinos, sin estar asociadas a regiones cercanas a los genes diferencialmente expresados (Figura 40).



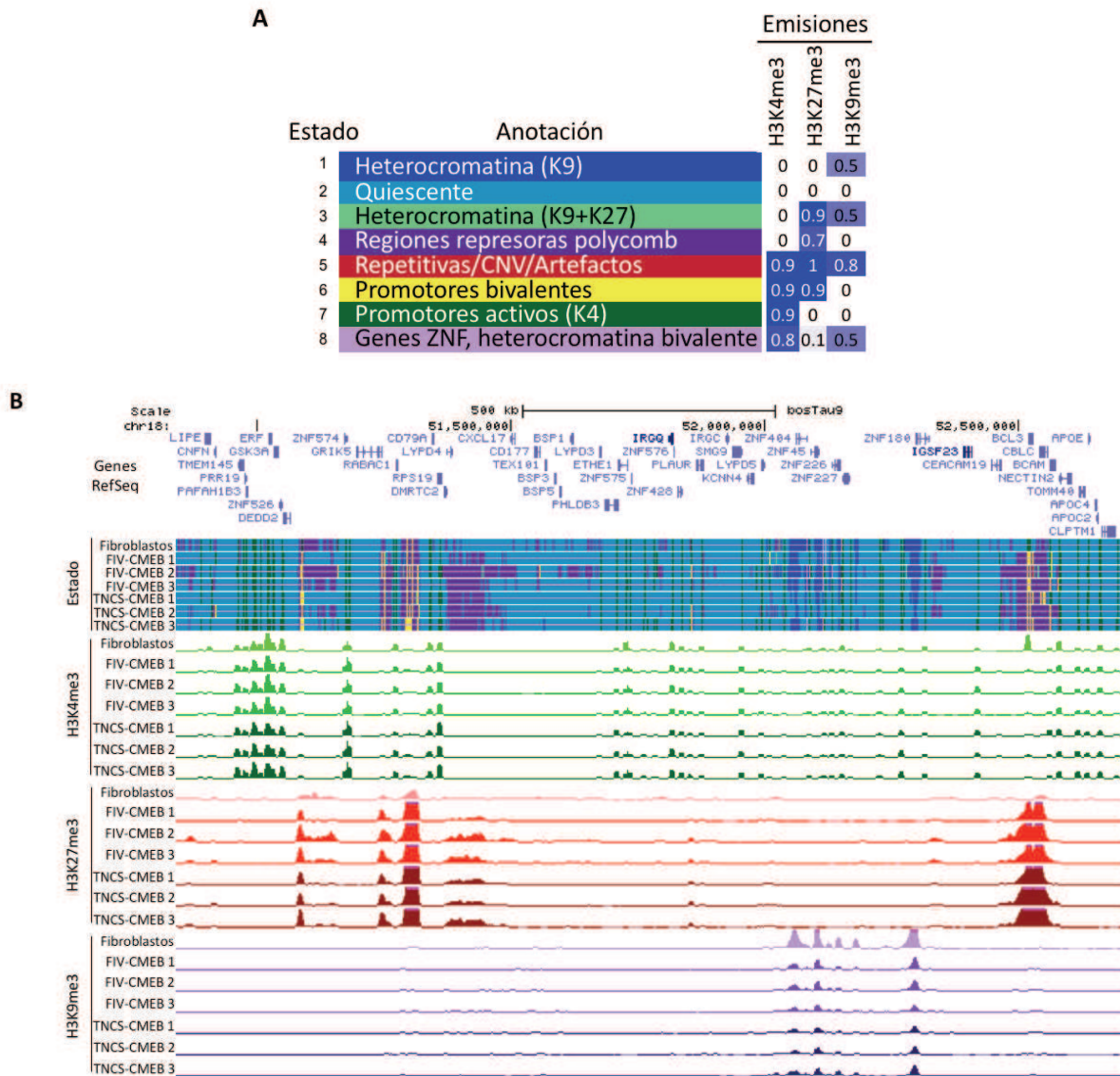
**Figura 40:** Esquema del cariotipo bovino mostrando la localización de los genes diferencialmente expresados y de las regiones con señal diferencial de las marcas de histonas entre las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB. En la figura se esquematizan los 30 pares de cromosomas bovinos, donde cada cromosoma está separado en 4 filas. La fila superior muestra la ubicación de los genes diferencialmente expresados en azul (si los genes diferencialmente expresados poseen mayor expresión en las líneas FIV-CMEB) o en rojo (si los genes diferencialmente expresados poseen mayor expresión en las líneas TNCS-CMEB). Las tres filas siguientes muestran la localización de las regiones con distinta señal de las marcas H3K27me3, H3K4me3 y H3K9me3, respectivamente, en azul o en rojo según si estas regiones poseen mayor expresión en las líneas FIV-CMEB o TNCS-CMEB.



De esta forma, concluimos que las regiones con señal diferencial de las marcas de histonas estudiadas no estarían vinculadas con la expresión génica diferencial observada entre las distintas fuentes de células madre embrionarias bovinas, descartando la existencia de una posible memoria epigenética heredada por las líneas TNCS-CMEB, al menos para las tres marcas de histonas estudiadas.

#### **4.6: Categorización de la cromatina según la combinación de las distintas marcas de histonas en las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS.**

Los resultados obtenidos hasta el momento revelaron escasas diferencias tanto en el transcriptoma como en el epigenoma de las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de distintas fuentes embrionarias. Sin embargo, para terminar de confirmar estos resultados, realizamos un último análisis en el cual investigamos si las células madre embrionarias bovinas provenientes de distintas fuentes embrionarias exhibían características similares en el estado de la cromatina. Con este fin, todo el genoma fue categorizado cada 200 pb en ocho estados, considerándose la señal combinada de cada modificación de histona, y siendo cada región clasificada como un estado de la cromatina único (Figura 41). Además, se asignó manualmente una anotación a cada estado teniendo en cuenta el contexto genómico en donde se encontraban las regiones, y si las regiones correspondían a genes anotados, elementos repetitivos o islas CpG.



**Figura 41:** Categorización de la cromatina según la señal combinada de cada una de las marcas de histonas estudiadas. **A.** Modelo de 8 estados de la cromatina (del inglés “*ChromHMM 8-state model*”) mostrando los 8 estados asignados, junto con su anotación y la emisión de las marcas de histonas asociadas (variando el rango de emisión de cada marca del 0 al 1). **B.** La imagen es una captura de la plataforma de análisis del genoma en donde se visualiza una región genómica con los 8 estados de la cromatina (cada color corresponde a un estado de la cromatina descrito en A) junto con la señal de las tres marcas de histonas analizadas (H3K4me3 en verde, H3K27me3 en rojo, H3K9me3 en violeta/azul).

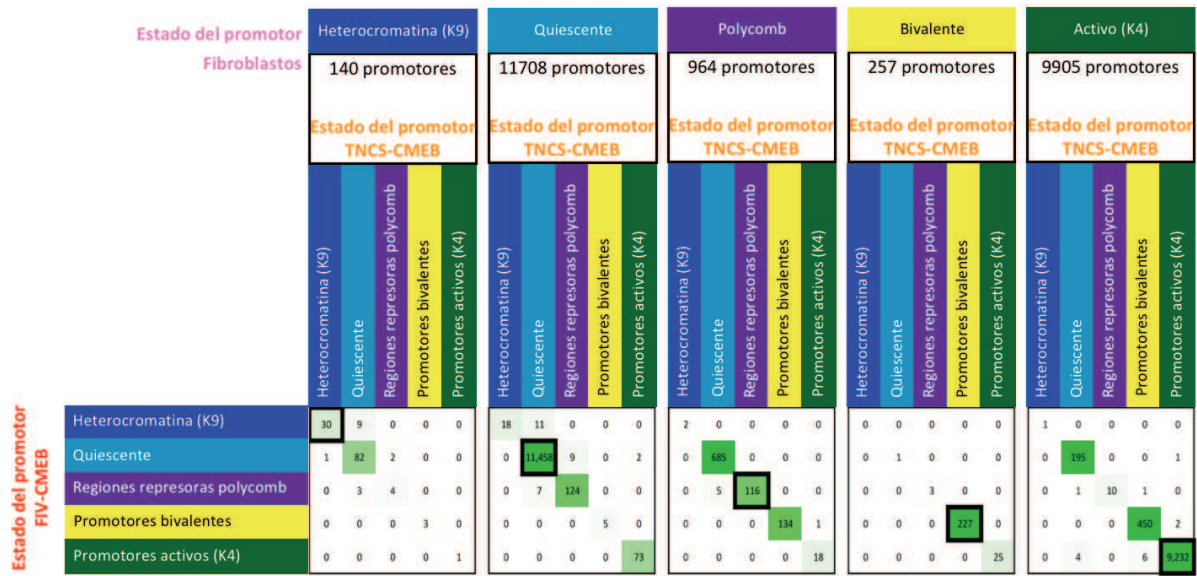
El estado 1, denominado como heterocromatina constitutiva y caracterizado por la presencia de la marca H3K9me3, estaba enriquecido como era de esperarse<sup>277</sup>, en regiones satelitales (regiones

de ADN repetidas en tándem que suelen encontrarse en regiones de heterocromatina constitutiva) en todos los tipos celulares (Figura 42A-B). El estado 2, denominado como cromatina quiescente, se refiere a la ausencia de emisión de señal de las tres marcas de histonas estudiadas y mostró ocupar la mayor proporción del genoma en todos los tipos celulares (Figura 42A-B). El estado 3, denominado como heterocromatina estaba caracterizado por la presencia de H3K9me3 y H3K27me3. La coexistencia de ambas marcas represivas en el mismo *loci* es considerado inusual ya que generalmente estas marcas son consideradas mutuamente excluyentes<sup>278-281</sup>; sin embargo, han sido detectadas en genes involucrados en el desarrollo en varias especies<sup>282-284</sup>. En este caso, este estado fue observado en regiones satelitales en ambas fuentes de CMEB y no en las células somáticas (Figura 42A). El cuarto estado caracterizado por el enriquecimiento de H3K27me3, fue denominado regiones represoras *polycomb*. Estas regiones actúan como represores transcripcionales, manteniendo la identidad celular durante el desarrollo<sup>285-287</sup>. Al igual que el tercer estado, éste también fue observado mayormente en regiones satelitales en las CMEB y no en las células somáticas (Figura 42A), indicando que la deposición de la marca H3K27me3 con o sin H3K9me3 en regiones satelitales, distinguiría a las CMEB de las células somáticas. Este estado también fue observado en regiones promotoras de todos los tipos celulares (Figura 42A-B). El estado 5, caracterizado por la presencia de las tres marcas analizadas en el mismo *loci*, mostró enriquecimiento en islas CpG en todos los tipos celulares (Figura 42A-B); sin embargo, dado que la presencia de las tres marcas en una misma región es poco frecuente, consideramos que este estado puede ser un artefacto del modelo, reflejando la dificultad del mismo para discriminar regiones que posean cierto grado de superposición. Los dominios bivalentes, caracterizados por la presencia de las marcas H3K4me3 y H3K27me3 (estado 6), fueron más frecuentes en las CMEB (estando presentes en un 0,3% del genoma) en comparación a los fibroblastos (0,1% del genoma) (Figura 42A). Como se observa en la Figura 42A-B, este estado se encontró principalmente en islas CpG y en sitios de inicio de la transcripción (TSS) en todos los tipos celulares. Esto se condice con la bibliografía, donde la presencia de estados bivalentes es observada frecuentemente en células madre en regiones promotoras con el fin de conferirles plasticidad a la hora de modular la transcripción de ciertos genes necesarios para la diferenciación celular<sup>288,289</sup>. El estado 7, denominado “promotores activos” y enriquecido por la marca H3K4me3, fue hallado predominantemente en sitios de inicio de la transcripción, como era de esperarse debido a la naturaleza de esta marca<sup>290</sup> (Figura 42A-B). Finalmente, el estado 8, caracterizado por la presencia



conservaban las mismas características en las líneas TNCS-CMEB. Sin embargo, encontramos numerosas diferencias en los estados de los promotores entre las CMEB y los fibroblastos. Por esta razón, continuamos el análisis haciendo foco en aquellos promotores que habían cambiado su estado entre las células madre pluripotentes y las células somáticas.

La mayoría de los promotores clasificados como activos en las células somáticas (n=9.905) conservaron el mismo estado en las células madre (93%), aunque un 5% (n=450) adquirieron la marca H3K27me3 y pasaron a un estado bivalente, y un 2% de los mismos perdieron la marca H3K4me3 y se inactivaron, cambiando a un estado quiescente (n=195), heterocromatina (n=1) o *polycomb* (n=10). Por otro lado, una pequeña fracción de los promotores que fueron clasificados en fibroblastos como estado de regiones represoras *polycomb* (n=964) retuvieron estas características en las células madre (12%), mientras que el 71% (n=685) y el 14% (n=134) pasaron a estados quiescentes o bivalentes, respectivamente. Además, 73 promotores clasificados en el estado quiescente en los fibroblastos se volvieron activos en las CMEB, 124 cambiaron a regiones represoras *polycomb*, y 18 a heterocromatina. Finalmente, como era de esperarse, los promotores clasificados como estados bivalentes fueron más frecuentes en las CMEB (n=227+450+134+5+3=819) que en los fibroblastos (n=257), lo cual se corresponde con las características descriptas previamente para las células madres pluripotentes<sup>288,289</sup>.



**Figura 43: Cambios en el estado de la cromatina de los promotores según el tipo celular.** En la figura se muestra el número de promotores asociados a un estado de la cromatina en las líneas FIV-CMEB, TNC5-CMEB y fibroblastos. A la izquierda se ubican las líneas FIV-CMEB en rojo, en la región intermedia se ubican las líneas TNC5-CMEB en naranja, y en el extremo superior se ubican los fibroblastos en magenta. Los cuadrados negros muestran la cantidad de promotores que poseen el mismo estado de la cromatina en todos los tipos celulares. Los cuadrados verdes muestran los genes que mostraron un cambio en el estado de la cromatina de su promotor entre todos los tipos celulares. Las distintas intensidades del color verde corresponden a la cantidad de promotores que mostraron un cambio de estado, siendo el verde más oscuro los que mayores cambios reflejaron y el verde claro los que menores cambios mostraron.

A continuación, estudiamos la función de los genes que mostraron un cambio en el estado de su promotor entre las células madre embrionarias bovinas y los fibroblastos. Con ese objetivo, clasificamos a los promotores como activos, inactivos o bivalentes considerando el estado de la cromatina y la expresión génica (Figura 42B panel derecho). Los estados inactivos incluyeron los estados clasificados como heterocromatina, quiescente y regiones reprimidas por *polycomb* dado que la expresión génica para esos estados era casi indetectable. Observamos que 92 promotores ( $n=73+18+1$ ) que estaban asociados con un estado activo en las CMEB e inactivo en los fibroblastos, regulaban la expresión de 83 genes que estaban involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia. Por el contrario, los 207 promotores ( $n=1+195+1+10$ ) que se encontraban activos en los fibroblastos e inactivos en las CMEB, regulaban a 183 genes que estaban vinculados con la organización de la matriz extracelular. Finalmente, los 819 promotores ( $n=227+450+134+5+3$ )

que tenían un estado bivalente en las CMEB, regulaban a 709 genes que estaban relacionados con el compromiso celular, con vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre, con la transcripción, la señalización de la vía de Wnt, entre otros (Tabla IX).

**Tabla IX: Enriquecimiento funcional de los genes asociados a aquellos promotores que sufrieron un cambio en el estado de la cromatina entre las líneas de CMEB y los fibroblastos.** En la tabla se indican el número de promotores que cambiaron de un estado activo (en verde), inactivo (heterocromatina/quiescente en azul) o bivalente (en amarillo) entre las CMEB y los fibroblastos, junto al número de genes regulados por estos promotores, el enriquecimiento funcional de los genes, el valor p, el FDR (del inglés “*False Discovery Rate*”), el OR (del inglés “*Odds Ratio*”) y z (que corresponde al número de desviaciones estándar que hay por encima o por debajo de la media de la población). Aquellos genes con un \* no mostraron enriquecimiento funcional. Sin embargo, los datos de ChEA (del inglés “*ChIP Enrichment Analysis*”) y ENCODE revelaron que los genes de ese grupo eran genes blanco de los factores de transcripción listados.

Estado	Tipo celular	Promotores	Genes	TF*/Enriquecimiento funcional	Genes asociados	Valor p	FDR	OR	z
Promotor activo	CMEB	92	83*	POU5F1*	-	13,55E-07	-	8,31	-
Heterocromatina Quiescente	Fibroblastos			SOX2*	-	17,35E-06	-	4,04	-
				TCF3*	-	14,71E-06	-	3,59	-
				NANOG*	-	17,39E-05	-	4,05	-
Promotor activo	Fibroblastos	207	183	Matriz extracelular proteica	14	6,70E-07	1,10E-04	-	4,77
Heterocromatina Quiescente	CMEB			Matriz extracelular	14	2,00E-06	1,70E-04	-	
				Componente estructural de la matriz extracelular	7	3,20E-05	9,40E-03	-	
				Organización de la matriz extracelular	8	1,80E-03	5,00E-01	-	
Bivalente K27 + K4	CMEB	142	126	Membrana postsináptica	12	8,80E-08	6,70E-06	-	5,09
Heterocromatina Quiescente	Fibroblastos			Unión celular	14	5,90E-06	2,30E-04	-	
				Densidad postsináptica	7	1,10E-03	2,70E-02	-	

Bivalente K27 + K4	CMEB	450	382	Regulación positiva de la transcripción mediada por el promotor de la ARN pol II	44	5,60E-07	5,60E-04	-	4,97
				Actividad activadora de la transcripción, Unión secuencia-específica de la región proximal del promotor de la ARN pol II	19	8,40E-07	2,20E-04	-	
				Actividad de factores de transcripción, unión secuencia-específica al ADN	39	2,30E-05	4,10E-03	-	
				Unión al ADN secuencia-específica de la región proximal del promotor de la ARN pol II	20	6,70E-05	8,70E-03	-	
				Transcripción del promotor ARN pol II	24	2,00E-04	3,90E-02	-	
Promotor activo	Fibroblastos								
Bivalente K27 + K4	Fibroblastos CMEB	227	201	Transcripción del promotor ARN pol II	23	4,10E-09	4,60E-06	-	5,06
				Unión secuencia-específica al ADN	21	1,10E-07	3,30E-05	-	
				Unión al ADN secuencia-específica de la región proximal del promotor de la ARN pol II	17	3,00E-07	4,40E-05	-	
				Actividad activadora de la transcripción, Unión secuencia-específica de la región proximal del promotor de la ARN pol II	14	4,30E-07	4,20E-05	-	
				Actividad de factores de transcripción, unión secuencia-específica al ADN	26	4,50E-06	3,30E-04	-	
				Actividad represora de la transcripción, Unión secuencia-específica de la región proximal del promotor de la ARN pol II	9	1,10E-05	6,50E-04	-	
				Regulación positiva de la transcripción mediada por el promotor de la ARN pol II	25	2,10E-05	6,00E-03	-	



				Regulación negativa de la transcripción mediada por el promotor de la ARN pol II	20	6,20E-05	1,40E-02	-	2,18
				Unión a la cromatina	12	1,30E-03	4,80E-02	-	
				Unión al ADN	17	5,40E-01	1,00E+00	-	
				Compromiso del destino celular	6	7,60E-05	1,40E-02	-	
				Señalización por la vía de Wnt	10	8,10E-05	1,30E-02	-	
				Carcinoma celular basal	5	9,80E-04	9,50E-02	-	
				Vías de señalización que regulan pluripotencia de las células madre	7	9,90E-04	4,90E-02	-	
				Vía de señalización hippo	7	1,50E-03	3,60E-02	-	
				Diferenciación neural	6	2,20E-03	1,40E-01	-	
				Vías cancerígenas	10	4,60E-03	7,50E-02	-	
				Señalización por la vía de Wnt	6	5,50E-03	7,60E-02	-	
				Señalización por la vía canónica de Wnt	4	4,60E-02	6,40E-01	-	
				Unión a dominios frizzled	3	4,60E-02	5,20E-01	-	
				Matriz extracelular proteica	7	4,80E-02	6,40E-01	-	
				Melanogenesis	4	5,00E-02	2,30E-01	-	
				Proteoglicanos cancerígenos	4	2,30E-01	6,20E-01	-	
				Infección HTLV-I	3	6,30E-01	9,50E-01	-	

En conclusión, los resultados expuestos a lo largo de este capítulo demostraron que las células madre embrionarias bovinas derivadas de embriones producidos por TNCS pueden ser establecidas con la misma eficiencia que aquellas derivadas a partir de embriones producidos por FIV, y que ambas poseen características pluripotentes similares. Además, utilizando tecnologías de última generación demostramos que el transcriptoma y epigenoma de las CMEB derivadas a partir de distintas fuentes embrionarias son similares o al menos poseen diferencias mínimas. Finalmente, la categorización de la cromatina a lo largo de todo el genoma exhibió que ambas fuentes de CMEB conservan patrones epigenéticos semejantes, sobre todo en regiones promotoras. Creemos que las escasas diferencias detectadas entre las dos fuentes de CMEB podrían ser de naturaleza estocástica, posiblemente relacionadas con la variabilidad genética de las líneas o con las técnicas de reproducción asistida utilizadas. De esta forma y considerando las marcas epigenéticas analizadas, concluimos que las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV o TNCS son equivalentes entre sí, sugiriendo que el macizo

celular interno proveniente de embriones producidos por TNCS sería correctamente reprogramado y se asemejaría al macizo celular interno proveniente de embriones producidos por FIV.

## ○ **Discusión y conclusiones generales**

## 5: Discusión y conclusiones generales.

Durante la presente tesis, nos propusimos evaluar las características moleculares del macizo celular interno de blastocistos bovinos producidos *in vitro* mediante distintas técnicas de reproducción asistida para estudiar cómo el uso de estas tecnologías podría impactar sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, realizar ensayos moleculares utilizando exclusivamente los MCI de un embrión es un proceso complejo, costoso y poco eficiente. Por un lado, se debería contar con un método para aislar las células únicamente del MCI, y actualmente los protocolos existentes resultan poco efectivos y no aseguran la obtención de una población homogénea libre de otros tipos celulares presentes en los blastocistos. Además, para obtener el número de células suficientes para llevar adelante los ensayos, se debería contar con un gran número de embriones y no sería posible estudiar variaciones individuales presentes en cada embrión. En base a esto, y considerando que las células madre embrionarias son derivadas a partir del MCI de un blastocisto y que las mismas poseen una capacidad proliferativa ilimitada *in vitro*, decidimos utilizarlas como modelo de estudio y evaluar si debido a una incorrecta reprogramación del MCI durante la técnica de TNCS, las CMEB derivadas a partir de embriones producidos por esta técnica presentan diferencias a nivel epigenético y transcriptómico en comparación a las CMEB derivadas a partir de embriones producidos por FIV.

Las células madre embrionarias bovinas fueron recientemente derivadas a partir de embriones de día 7 de desarrollo de distintas razas producidos por FIV, aspiración folicular *in vivo* y posterior FIV, TNCS o transferencia nuclear (se emplearon células madre como donantes nucleares) utilizando iMEF como capa nutricia y el medio denominado CTFR el cual fue suplementado con el factor FGF2 y el inhibidor IWR1<sup>193</sup>. Las células derivadas en estas condiciones fueron las primeras en mantener un fenotipo estable y demostrar verdadera pluripotencia en la especie bovina y exhibieron un perfil de expresión semejante con el estado de pluripotencia *primed*. Sin embargo, las condiciones utilizadas para el establecimiento de estas líneas eran complejas, inaccesibles para nuestro laboratorio y poco reproducibles. En base a esto, y con el fin de poder utilizar a las CMEB como modelo de estudio, fue necesario simplificar las condiciones de cultivo originalmente descriptas para la obtención de dichas células. En la presente tesis demostramos que es posible derivar y mantener líneas de células madre embrionarias bovinas utilizando medios de cultivo comerciales y matrices libres de células.

El medio CTFR se basa en la formulación del medio comercial mTeSR1 <sup>251</sup> pero su principal diferencia con éste es que carece de los factores de crecimiento FGF2 y TGFβ1 en su formulación basal. Este medio no está disponible comercialmente, sino que es preparado por una instalación del Instituto Salk en San Diego, Ca, USA, lo que dificulta su accesibilidad. Además, dado que su formulación consiste en la mezcla de más de 50 reactivos entre los cuales se encuentra el medio DMEM/F12 (que a la vez consiste en la mezcla de varias sales), ácido L-ascórbico, selenio, transferrina, bicarbonato de sodio, insulina, BSA, glutatión, L-glutamina, lípidos definidos, β-mercaptoetanol, ácido piperídico, cloruro de litio, ácido γ-aminobutírico (GABA), etc, su preparación resulta compleja y suele presentar inconsistencias entre lotes, disminuyendo su reproducibilidad.

Con el fin de sustituir al medio CTFR por alternativas simples y disponibles comercialmente, decidimos evaluar los medios E6, mTeSR Plus y N2B27 debido a que poseen una composición similar al medio originalmente descrito y a que han sido previamente utilizados en el cultivo de células madre pluripotentes de otras especies <sup>140,250,260,261</sup>. El medio mTeSR Plus es un medio comercial que al igual que el medio CTFR, está basado en la formulación del medio mTeSR1 con la excepción de que éste incluye FGF2 y TGFβ1 en su formulación basal y posee modificaciones que estabilizan la vida media del FGF2 y el pH <sup>261</sup>. En el caso del medio E6, éste está compuesto por únicamente 6 componentes, entre los cuales se incluyen el medio DMEM/F12, ácido L-ascórbico, selenio, transferrina, bicarbonato de sodio e insulina <sup>250</sup>. Finalmente, el medio N2B27 consta de la mezcla de 7 componentes comerciales que incluyen el medio DMEM/F12, el medio Neurobasal, el suplemento N2, el suplemento B27, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y β-mercaptoetanol <sup>140,260</sup>. Si bien en los tres medios evaluados se emplea como medio basal el DMEM/F12, únicamente el medio mTeSR Plus pudo ser utilizado para mantener el fenotipo de las células madre embrionarias bovinas.

A diferencia de los otros medios evaluados, el medio mTeSR Plus es el único que incluye BSA en su formulación en una concentración aproximada del 1%, al igual que el medio CTFR. La BSA es una proteína que puede actuar como antioxidante, como transportadora de lípidos y metales iónicos, y actúa a nivel del metabolismo, proliferación y viabilidad celular <sup>292</sup>. Esta proteína es uno de los componentes principales del suero y ha sido utilizada para mantener la viabilidad celular en medios de cultivo que no poseen suero en su formulación <sup>292</sup>. En base a esto, decidimos suplementar a los medios N2B27 y E6 con distintas concentraciones de BSA y evaluar el fenotipo

de las CMEB. La suplementación del medio N2B27 con BSA demostró que, a mayor concentración de la misma, las células crecieron formando colonias definidas de mayor tamaño y la expresión de los marcadores de pluripotencia resultó más homogénea, indicando que la presencia de BSA es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia. Sin embargo, la adición de BSA no fue suficiente para mantener el estado pluripotente de las células cultivadas en el medio E6. Tanto en bajos como en altos niveles de BSA, las células perdieron su tasa proliferativa y expresaron de manera heterogénea los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2. Estos resultados demuestran que aún en presencia de BSA, FGF2 e IWR1, los seis componentes incluidos en el medio E6 no son suficientes para mantener el estado pluripotente de las CMEB y que es necesario utilizar medios más enriquecidos como el medio mTeSR Plus y el medio N2B27. En concordancia con estas observaciones, combinaciones del medio N2B27 y del medio mTeSR Plus en presencia de BSA y KSR han sido recientemente utilizadas para obtener células madre pluripotentes inducidas y células madre de potencial expandido en la especie bovina <sup>154,195</sup>.

Si bien no se conoce con exactitud el rol de la BSA en el mantenimiento de las células madre pluripotentes, existen reportes que demuestran que ayudaría a prevenir posibles efectos citotóxicos asociados al uso del  $\beta$ -mercaptoetanol en el cultivo <sup>250</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo no sólo no observamos un efecto citotóxico relacionado con el uso del  $\beta$ -mercaptoetanol en medios sin BSA (como por ej. el medio N2B27 sin BSA), sino que además, observamos que la incorporación de BSA mejoró la viabilidad de las células aún en medios que carecían de  $\beta$ -mercaptoetanol en su formulación (como por ej. el medio E6), indicando que la BSA no sólo actuaría como citoprotector respecto al  $\beta$ -mercaptoetanol, sino que además tendría un rol más amplio en el mantenimiento de la pluripotencia el cual aún queda pendiente determinar.

Por otro lado, considerando que el KSR es un suplemento que se utiliza ampliamente en el cultivo de células madre pluripotentes de diversas especies <sup>293,294</sup>, quisimos estudiar si era posible cultivar a las CMEB en medios suplementados con dicho suplemento. La suplementación del medio E6 o del medio N2B27 con KSR en distintas concentraciones no fue suficiente para mantener la auto-renovación celular, dado que se observó una disminución en la tasa proliferativa de las células y la pérdida de su morfología de crecimiento. El KSR tiene como componente proteico a una albúmina rica en lípidos conocida como AlbuMAX, la cual se sabe que participa en el mantenimiento de la auto-renovación celular de células madre pluripotentes humanas <sup>295</sup>. Por el contrario, la BSA que utilizamos en la formulación de los medios de cultivo posee un bajo

contenido de ácidos grasos, lo que podría explicar, en parte, por qué el KSR no pudo ser utilizado como reemplazo de la BSA en el cultivo de las CMEB.

En conjunto, estos resultados demuestran que el mantenimiento del fenotipo pluripotente de las células madre embrionarias bovinas requiere de la utilización de medios enriquecidos que incluyan BSA con bajos niveles de ácidos grasos entre sus componentes, quedando pendiente aclarar el rol que cumple esta proteína en el cultivo de las células madre embrionarias bovinas.

Habiendo determinado que el medio mTeSR Plus y el medio N2B27 suplementado con 1% de BSA y en presencia de FGF2 e IWR1 (condiciones denominadas TPFER y NBFR, respectivamente) podían ser utilizados para sustituir al medio CTFR durante el cultivo de las CMEB, en el siguiente paso analizamos si en estas condiciones era posible establecer nuevas líneas de células madre embrionarias bovinas. Para ello, derivamos líneas de CMEB utilizando las condiciones NBFR y TPFER a partir de blastocistos individuales, grupos de blastocistos o MCI aislados por inmunocirugía de embriones de 7 días de desarrollo producidos por fecundación *in vitro*. Al igual que para las condiciones CTFR<sup>193</sup>, luego de 3 o 4 semanas de cultivo, logramos obtener colonias con una morfología plana y bordes irregulares, las cuales eran fácilmente disociadas mediante el uso de enzimas. La eficiencia de derivación en condiciones NBFR o TPFER fue de aproximadamente un 30% cuando las líneas eran derivadas tanto de blastocistos como de MCI aislados, lo cual coincide con lo reportado previamente para las líneas de células madre embrionarias bovinas derivadas en condiciones CTFR<sup>193</sup>. Previamente se han reportado eficiencias similares en la derivación de células madre pluripotentes porcinas y bovinas las cuales fueron derivadas a partir de blastocistos producidos *in vivo* o por FIV<sup>153,154,196</sup>. Poder obtener CMEB a partir de blastocistos en lugar de utilizar MCI aislados no sólo simplifica el proceso de derivación, sino que también indica que las condiciones de cultivo utilizadas favorecen el crecimiento de las células provenientes del epiblasto por sobre las células del TE y/o endodermo primitivo/hipoblasto. De hecho, al analizar por inmunofluorescencia la expresión de CDX2 (marcador de TE) y de GATA6 (marcador de endodermo primitivo/hipoblasto), observamos que en los inicios del cultivo estas poblaciones celulares fueron mayoritarias en relación al número total de células, pero a medida que las células fueron sub-cultivadas, estas poblaciones disminuían y únicamente sobrevivían aquellas células que expresaban los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 (marcadores del epiblasto).

Para validar la pluripotencia de las células madre, es necesario realizar una serie de ensayos que toman como referencia lo reportado en líneas humanas y murinas<sup>263</sup>. Éstos involucran la detección

de la actividad de enzima fosfatasa alcalina, la expresión de factores de pluripotencia y antígenos de superficie, verificar la estabilidad cromosómica, y evaluar la capacidad proliferativa y de diferenciación de las células. No obstante, se observó que existían diferencias en cuanto a la batería de genes y de antígenos de superficie expresados en cultivos de células madre de distintas especies<sup>113</sup>. Estas diferencias indican que las características descritas para humanos y/o murinos no pueden ser extrapoladas a otras especies, sino que los perfiles de expresión son especie-específicos y dependen del estado de pluripotencia que poseen las células madre obtenidas *in vitro*<sup>113</sup>. Sumado a esto, la disponibilidad de anticuerpos especie-específicos es limitada (sobre todo en animales de granja) lo que dificulta aún más la detección de la expresión proteica de estos factores de forma precisa. A pesar de esto, la determinación de la expresión de los factores OCT4, SOX2 y NANOG ha sido ampliamente utilizada para validar la pluripotencia de las células madre derivadas a partir de animales de granja<sup>113</sup>.

Durante este trabajo, analizamos la expresión de los factores de pluripotencia OCT4 y SOX2 durante el cultivo *in vitro* para las líneas de CMEB derivadas en condiciones NBFR y TPF. Al igual que otras líneas de células madre pluripotentes bovinas<sup>154,193-195</sup>, las líneas celulares derivadas en ambas condiciones mostraron una expresión homogénea de estos factores a lo largo de numerosos pasajes. En paralelo analizamos la expresión de los antígenos de superficie TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA1 y SSEA4 en las líneas CMEB obtenidas en condiciones NBFR. Mediante inmunofluorescencia, observamos que las células expresaban únicamente el antígeno SSEA4, el cual también ha sido detectado en células del TE y MCI de embriones bovinos<sup>296</sup>. SSEA4 es un factor característico de células madre pluripotentes humanas<sup>110,223</sup> aunque su expresión también ha sido detectada en células madre pluripotentes porcinas<sup>153,196</sup> y en células madre pluripotentes inducidas y de potencial expandido en la especie bovina<sup>194,195</sup>. En cuanto a los factores TRA-1-60 y TRA-1-81, éstos también son característicos de células madre pluripotentes humanas<sup>110,223</sup>, y han sido detectados en las recientemente derivadas células madre embrionarias porcinas<sup>153</sup>. En la especie bovina, si bien la expresión del antígeno TRA-1-60 fue analizada y observada en células madre pluripotentes inducidas<sup>195</sup>, en las líneas establecidas durante este trabajo la expresión de TRA-1-60 y TRA-1-81 no fue detectada. Finalmente, el factor SSEA1 es un marcador característico de células madre pluripotentes murinas<sup>115</sup>, y en especies de granja, sólo ha sido detectado en células pluripotentes porcinas<sup>153,196</sup>. En base a esto, queda claro que los factores de transcripción vinculados con el mantenimiento de la pluripotencia celular resultan más confiables



para validar una línea de células madre ya que presentan menor variabilidad inter-especies que los antígenos de superficie. De todos modos, vale aclarar que resulta difícil realizar un análisis comparativo ya que los diferentes reportes emplean anticuerpos distintos (aún para una misma especie) y líneas celulares con distintos grados de potencia.

Las líneas de CMEB obtenidas en condiciones NBFR y TPFr durante este trabajo mostraron expresión homogénea de los marcadores de pluripotencia, actividad de la enzima fosfatasa alcalina y mantuvieron un cariotipo estable durante el cultivo *in vitro*. Además, las líneas NBFR-CMEB conservaron su tasa proliferativa a lo largo del tiempo y mostraron capacidad de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* originando derivados de las tres capas embrionarias, lo que demuestra su naturaleza pluripotente. La diferenciación *in vitro* fue evaluada mediante un ensayo de formación y cultivo de cuerpos embrionarios en presencia de suero fetal bovino como agente diferenciante. Luego de 21 días de diferenciación, detectamos la expresión de marcadores característicos del linaje ectodérmico (*Pax6*), endodérmico (*Foxa2*, *Sox17*) y mesodérmico (*Cdx2*), mientras que la expresión del marcador de pluripotencia *Oct4* disminuyó. Curiosamente, observamos que en condiciones control (es decir en ausencia del agente diferenciante) las células expresaban *Pax6*, al igual que lo reportado para las líneas de CMEB establecidas en condiciones CTFR<sup>193</sup>. Esto podría deberse a que en el cultivo existe una proporción de células que se diferenciaron de forma espontánea hacia derivados ectodermales y/o a que una proporción de células posee cierto compromiso con este linaje y por lo tanto expresan de forma simultánea factores marcadores de pluripotencia y factores marcadores de ectodermo, mecanismos que pueden ser estimulados por los componentes del medio de cultivo, la densidad celular, la variación genética y/o la variabilidad de la capa nutricia utilizada<sup>34,297</sup>. En el cultivo de células madre pluripotentes se ha descrito un estado denominado “meta-estabilidad” que hace referencia a la presencia de células indiferenciadas y diferenciadas y/o preparadas para ser diferenciadas a un linaje en particular en un mismo cultivo, lo que resulta en la expresión simultánea de genes específicos de un linaje y genes específicos de la pluripotencia<sup>298,299</sup>. Los autores Loh y Lim<sup>300</sup> han desestimado que la pluripotencia sea un estado celular intrínsecamente estable y basal de las células pluripotentes, y han postulado que en realidad, la pluripotencia es una condición intrínsecamente inestable la cual se define por la competencia entre los factores de transcripción que especifican el linaje y los factores de pluripotencia. De hecho, durante el desarrollo *in vivo*, las células pluripotentes no persisten en ese estado durante períodos prolongados. El desarrollo embrionario es un proceso

continuo en donde las células que componen el epiblasto adquieren un estado pluripotente transitorio el cual se pierde conforme se originan todos los tejidos embrionarios. De esta forma, los autores postulan que la pluripotencia no está determinada por factores que inhiben la diferenciación y preservan el estado indiferenciado, sino que estos factores están continuamente actuando para especificar a las células a un determinado linaje. La expresión simultánea de factores de pluripotencia y diferenciación es un reflejo de cuán dinámico es el estado transcripcional que presentan las células pluripotentes. Además, se ha demostrado que no todas las células presentes en un cultivo responden de la misma manera a las distintas señales extrínsecas<sup>301</sup>. Por ejemplo, en murinos se ha observado que luego de suplementar el medio de cultivo con el factor LIF, muchas células no logran transducir correctamente la señal, y por lo tanto no logran expresar los genes blanco (*Klf4* y *Tbx3*), lo que resulta en un cultivo heterogéneo con poblaciones celulares que poseen un perfil de expresión diferencial<sup>301</sup>. Esta heterogeneidad provoca que ciertas células sean más propensas a diferenciarse espontáneamente, lo que podría explicar en parte, los resultados obtenidos para las líneas establecidas durante este trabajo. No obstante, es importante aclarar que la expresión parcial de genes específicos de un linaje determinado no afectó la estabilidad ni potencialidad celular ya que éstas fueron mantenidas de forma estable por múltiples pasajes sin que pierdan la expresión de los marcadores de pluripotencia y pudieron ser diferenciadas *in vitro* e *in vivo* formando teratomas que contenían derivados de las tres capas embrionarias luego de ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos.

Una vez que logramos reemplazar al medio CTFR por alternativas comerciales, y habiendo demostrado que estas nuevas condiciones podían ser utilizadas para derivar y mantener el estado indiferenciado de las células madre embrionarias bovinas, decidimos a continuación reemplazar a los iMEF por matrices libres de células. Los iMEF se han utilizado como capa nutricia en el cultivo de células madre pluripotentes de numerosas especies ya que secretan factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión y componentes de la matriz extracelular, que favorecen la auto-renovación y pluripotencia<sup>252</sup>. Debido a que los factores secretados por estas células aún no han sido completamente determinados, obtener líneas de células madre embrionarias bovinas en condiciones libres de iMEF presenta la ventaja de aportar reproducibilidad al proceso y evita trabajar con co-cultivos (células somáticas murinas y células pluripotentes bovinas en este caso). Numerosas líneas de células madre pluripotentes murinas y humanas han sido derivadas y expandidas sobre matrices libres de células entre las cuales se incluyen Matrigel, Fibronectina,

Vitronectina, Laminina, entre otras <sup>169,170,251,266,302-304</sup>. Sin embargo, la utilización de matrices sintéticas en especies de granja ha sido escasamente investigada. Recientemente, el Matrigel y la Fibronectina han sido utilizados para expandir células madre pluripotentes equinas y células madre pluripotentes bovinas de potencial expandido, respectivamente, logrando mantener la morfología y características pluripotentes de las células <sup>154,159</sup>. Por otro lado, utilizando Vitronectina tanto natural como recombinante se han obtenido resultados similares a los observados cuando se utiliza Matrigel durante la derivación y expansión de células madre pluripotentes humanas en condiciones de cultivo químicamente definidas <sup>250,268</sup>. No obstante, al día de la fecha no existen reportes que involucren el uso de la Vitronectina en la derivación o cultivo de células madre pluripotentes de animales de granja.

Por lo expuesto anteriormente, analizamos si las células madre embrionarias bovinas podían prescindir de forma total o parcial del uso de los iMEF desde etapas iniciales del cultivo, y probamos tres posibles condiciones de derivación para establecer líneas de CMEB. Con el fin de eliminar el uso de los iMEF en su totalidad, utilizamos Vitronectina desde el inicio del cultivo; mientras que, para eliminar el uso de los iMEF de forma parcial, utilizamos Vitronectina y medio condicionado por los iMEF, o iMEF durante el pasaje cero (momento en que se siembran los blastocistos) y continuamos los sucesivos pasajes sobre Vitronectina. Sin embargo, en ninguna de las condiciones fue posible derivar líneas de CMEB, sugiriendo que la Vitronectina no sería suficiente para favorecer el crecimiento de las células derivadas del epiblasto. La condición en la que se utilizaron iMEF durante el pasaje cero fue la que, cualitativamente, demostró mayor crecimiento de las células derivadas del epiblasto, aunque el crecimiento celular se detuvo una vez que las líneas fueron sub-cultivadas en Vitronectina. Por lo tanto, es posible que el rol de los iMEF no sea únicamente como soporte físico, sino que también exista un efecto parácrino sobre las CMEB por parte de las células murinas mediante la acción de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, matriz extracelular y/o citoquinas secretadas. Sería interesante derivar líneas de CMEB utilizando iMEF durante el pasaje cero, y luego cultivarlas sobre Vitronectina pero en presencia de medio condicionado para analizar si la línea logra establecerse. Otra posibilidad podría consistir en evaluar otras matrices que hayan sido utilizadas con éxito en la expansión de células madre pluripotentes bovinas (como por ej. la Fibronectina) para analizar si es posible derivar a las CMEB en las mismas.

Pese a la imposibilidad de derivar líneas de CMEB directamente sobre Vitronectina, pudimos observar que una vez que la línea ya había sido establecida sobre iMEF, éstas podían ser cultivadas sobre Vitronectina o incluso Matrigel tanto en condiciones CTFR como NBFR, manteniendo una expresión homogénea de los factores de pluripotencia. Sin embargo, en ausencia de iMEF, las células perdieron la morfología típica de crecimiento en colonias y crecieron formando una monocapa celular. Cambios en la morfología celular pueden estar asociados con inestabilidades del citoesqueleto, diferenciación o transformación celular<sup>305-307</sup>. Sin embargo, las células cultivadas sobre Vitronectina en condiciones NBFR mantuvieron un cariotipo euploide, la tasa proliferativa, la expresión de los factores de pluripotencia en casi la totalidad del cultivo (~99%), y fueron capaces de diferenciarse *in vitro* a derivados de las tres capas embrionarias. Además, cuando las células fueron cultivadas nuevamente sobre iMEF, éstas crecieron formando colonias, lo que demuestra que los cambios en la morfología de crecimiento eran de carácter reversible y no afectaban el comportamiento celular. En células madre pluripotentes de otras especies como el humano, se ha demostrado que la molécula de adhesión alfa-V- $\beta$ -5 integrina es la responsable de interactuar con la Vitronectina<sup>268</sup>. Cuando las moléculas de adhesión se unen a un ligando o receptor específico, se produce un cambio conformacional en el dominio extracelular, lo que afecta la función de las células y produce cambios intracelulares en el citoesqueleto. Dado que aún no se conoce el perfil de expresión de las moléculas de adhesión de las células madre pluripotentes en la especie bovina, sería interesante determinar si es la alfa-V- $\beta$ -5 integrina o alguna otra molécula la responsable de interactuar con la Vitronectina, e investigar si los cambios morfológicos observados son productos de dicha interacción.

Cabe destacar que tanto en ausencia como en presencia de iMEF durante el cultivo extendido *in vitro* (más de 20 pasajes), fue necesario suplementar el medio de cultivo con Activina A para que las células logren mantener la tasa proliferativa y la expresión homogénea de los factores de pluripotencia. Ha sido reportado que los iMEF secretan Activina A al medio de cultivo la cual actúa de forma parácrina sobre las células madre pluripotentes, modificando su estado pluripotente<sup>252</sup>. Este factor junto a otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  como Nodal y TGF $\beta$ , poseen un rol fundamental en mantener el programa de pluripotencia al interactuar con los factores de transcripción SMAD2/3 los cuales pueden unirse al promotor de *Nanog* y modificar su expresión<sup>271,308,309</sup>. La Activina A es un compuesto frecuentemente utilizado en el cultivo de células madre pluripotentes humanas e incluso en las recientemente establecidas células madre pluripotentes

equinas, bovinas y porcinas tanto en presencia como en ausencia de iMEF<sup>154,159,198,276</sup>. En células madre embrionarias humanas cultivadas en presencia o ausencia de iMEF se ha demostrado que la adición exógena de este factor aumenta los niveles de expresión de los factores de pluripotencia y disminuye la diferenciación espontánea de las células, lo que resulta en cultivos más homogéneos<sup>310</sup>. En concordancia con estos antecedentes, nuestros resultados demostraron que es necesario adicionar Activina A en la formulación del medio cuando las CMEB son cultivadas sobre matrices libres de células. Además, observamos que cuando las CMEB eran cultivadas sobre iMEF por más de 20 pasajes, una proporción de las células perdían su fenotipo pluripotente, el cual podía ser restaurado luego de adicionar Activina A en el medio de cultivo, posiblemente debido a la relación que existe entre la presencia de este factor y la modulación de genes asociados con la pluripotencia. Futuros estudios serán necesarios para estudiar en detalle el rol de la vía de la Activina A en el cultivo de las CMEB.

Al igual que la Activina A, el factor TGF $\beta$ 1 también interactúa con las proteínas SMAD2/3 modificando la expresión de genes relacionados con la pluripotencia<sup>308</sup>. La presencia de este factor junto al FGF2, ha demostrado mantener la auto-renovación y la expresión de marcadores de pluripotencia en las CMEB derivadas durante esta tesis en condiciones TPF $\beta$ R, así como también en células madre pluripotentes inducidas y de potencial expandido de la especie bovina<sup>154,195</sup>, y en células madre pluripotentes humanas<sup>311,312</sup>. Por esta razón, quisimos evaluar si el TGF $\beta$ 1 era capaz de sustituir a la Activina A cuando las CMEB eran cultivadas sobre Vitronectina en condiciones NBFR. Nuestros resultados demostraron que, si bien la suplementación conjunta de TGF $\beta$ 1 y Activina A no modifica el fenotipo de las CMEB, los efectos de la Activina A no pueden ser reemplazados por el agregado de TGF $\beta$ 1 al menos en las concentraciones evaluadas. Estos resultados coinciden con lo reportado para el cultivo de células madre bovinas de potencial expandido donde la inclusión de ambos factores fue necesaria para mantener la pluripotencia celular<sup>154</sup>. Queda pendiente investigar el rol que poseen las vías de señalización de Activina A y TGF $\beta$  en las CMEB, con el fin de caracterizarlas y analizar sus similitudes con otras especies. Además, sería interesante estudiar el efecto de otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  como por ejemplo Nodal.

Durante este trabajo y en concordancia con la bibliografía existente en la especie bovina<sup>154,193,195</sup> y en otras especies domésticas<sup>153,159,196,197</sup>, demostramos que la inhibición de la vía de señalización de Wnt mediante el uso de IWR1 junto con la estimulación de la vía de FGF2 eran esenciales para

poder establecer y mantener el estado pluripotente de las células. El factor de crecimiento FGF2 activa la vía de señalización MAPK/AKT/ERK, la cual está implicada en la regulación de genes de pluripotencia y de muerte celular<sup>313,314</sup>. De manera similar a lo reportado para las células madre pluripotentes murinas y humanas<sup>272,273</sup>, el uso de FGF2 en el cultivo de las CMEB demostró ser esencial para el mantenimiento de la auto-renovación ya que en ausencia de este factor, las células no proliferaban.

La señalización mediada por Wnt constituye una vía altamente compleja que participa en la regulación de numerosos procesos celulares, y cuenta con una variedad enorme de agonistas y antagonistas que pueden afectar a múltiples vías de señalización<sup>199,209-212</sup>. Además, dependiendo del tipo celular y del grado de pluripotencia de las células estudiadas, se han descrito distintos roles para la vía de señalización de Wnt. Por ejemplo, en células madre pluripotentes *naive* la activación de la vía de Wnt estabiliza el estado pluripotente y la auto-renovación celular, mientras que la inhibición de esta vía produce que las células adquieran un fenotipo *primed* o que sean más sensibles a señales de diferenciación<sup>209,215,216</sup>. Por el contrario, en células madre pluripotentes *primed* la activación de la vía induce la diferenciación de las células hacia el linaje mesodérmico<sup>219</sup>, mientras que su inhibición disminuye la diferenciación espontánea, mejora la homogeneidad en el cultivo, la expansión clonal y la eficiencia de derivación<sup>140,217-221</sup>. En la especie bovina, se ha observado que la modulación de esta vía es capaz de determinar el destino de las células que conforman embriones en estadios pre-implantatorios<sup>315,316</sup>. Además, se ha demostrado que inhibir la vía de señalización de WNT mediante el uso de IWR1 (o del inhibidor IWR2<sup>317</sup>) es indispensable para establecer líneas de células madre embrionarias en condiciones CTFR<sup>193</sup>, mientras que para establecer líneas de células madre de trofoblasto se requiere activar a esta vía mediante la adición del factor Wnt3a<sup>214</sup>.

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que, al igual que para las líneas CTFR-CMEB<sup>193</sup>, la inhibición de la vía de Wnt mediante el agregado de IWR1 al medio de cultivo, también es necesaria para derivar líneas de CMEB en condiciones NBFR. Si bien aún no se ha logrado determinar el rol exacto de este inhibidor (dado que puede actuar sobre distintas vías de señalización dependientes o independientes de Wnt<sup>317</sup>), a partir de nuestros resultados podemos inferir que IWR1 actuaría manteniendo la pluripotencia de las células derivadas del MCI y/o inhibiendo la expansión de células derivadas de linajes extraembrionarios durante el establecimiento de las CMEB. Curiosamente, observamos que la adición de IWR1 en condiciones

NBFR era necesaria para mantener la expresión de los marcadores de pluripotencia de las CMEB únicamente cuando éstas eran cultivadas sobre iMEF, pero no cuando las mismas eran cultivadas sobre Vitronectina. Dado que los iMEF secretan ligandos que estimulan la vía de señalización de Wnt<sup>214,215</sup>, inferimos que éstos podrían estar causando la activación de la vía, provocando la diferenciación celular (efecto que sería inhibido por la acción de IWR1). Para corroborar esta teoría, cultivamos a las CMEB obtenidas en condiciones NBFR sobre Vitronectina en presencia de distintas concentraciones del inhibidor CHIR99021 (el cual a través de su acción inhibitoria sobre la quinasa GSK3b produce la activación de la vía de señalización canónica de Wnt) y en presencia o ausencia de IWR1. Como anticipamos, en presencia de IWR1 y CHIR99021 no observamos cambios en el fenotipo de las CMEB. Existen reportes que demuestran que la acción conjunta de estos dos inhibidores ha sido exitosamente utilizada para mantener la auto-renovación de células madre pluripotentes *primed* murinas, humanas y porcinas<sup>196,217,222</sup>, y permitieron la obtención de células madre pluripotentes de potencial expandido en la especie murina, humana, porcina e incluso bovina<sup>151,153,154</sup>. No obstante, cuando las células fueron cultivadas únicamente con CHIR99021 y sin IWR1, éstas perdieron la expresión de los marcadores de pluripotencia luego de 4 pasajes, lo que indicó que era necesario mantener a la vía de señalización de Wnt inactiva para poder conservar el estado indiferenciado de las células.

En conjunto, las condiciones de cultivo descritas durante esta tesis nos permitieron investigar el rol de las distintas vías de señalización en el mantenimiento del programa de pluripotencia bovino, el cual dependería de la inactivación de la vía de Wnt y de la activación de las vías de FGF2 y Activina A. La dependencia de estos factores para el mantenimiento de la pluripotencia sugiere que las CMEB obtenidas tendrían un estado de pluripotencia característico de células pluripotentes *primed*, aunque será necesario realizar futuros estudios como un ensayo de contribución a quimeras para determinar el verdadero estado de pluripotencia y evaluar el rol de la vía de Wnt en relación al de otras especies.

Luego de haber simplificado las condiciones de cultivo de las CMEB y obtenido numerosas líneas de CMEB derivadas a partir de embriones producidos por FIV en estas condiciones, el siguiente paso consistió en derivar líneas de CMEB a partir de blastocistos individuales producidos por TNCS. Las líneas FIV-CMEB fueron utilizadas como referencia para comparar nuestros resultados ya que al igual que la técnica de TNCS, la FIV también es una tecnología realizada *in vitro* y comparte algunas etapas con la técnica de TNCS (por ej. la maduración oocitaria y el cultivo

embrionario). Además, dado que como control de la técnica de clonación produjimos embriones por activación partenogenética, decidimos derivar líneas de CMEB a partir de esta fuente embrionaria e incluirla en nuestros estudios.

Como fue mencionado previamente, la eficiencia de la TNCS ronda entre el 0-10% de embriones transferidos que resultan en una descendencia viable, posicionándola como una técnica extremadamente ineficiente <sup>100</sup>. Esto se debe en parte, a que los embriones generados por TNCS poseen una memoria epigenética la cual es el resultado de un borrado incompleto de marcas presentes en la célula somática utilizada como donante nuclear, y de fallas en la deposición de nuevas marcas que sean compatibles con el futuro desarrollo embrionario y fetal <sup>236</sup>. En otras palabras, durante la TNCS el núcleo donante proveniente de una célula somática debe adquirir una nueva identidad totipotente, estableciendo la expresión finamente orquestada de ~10.000- 20.000 genes encargados de regular el desarrollo embrionario y fetal <sup>318</sup>. Estos cambios en la identidad celular son llevados a cabo por modificaciones en la configuración de la cromatina, las cuales están principalmente relacionadas con metilaciones, acetilaciones de histonas, y con la metilación del ADN <sup>318</sup>. El correcto progreso de estas modificaciones asegurará que el desarrollo embrionario ocurra adecuadamente, desde las primeras divisiones celulares y compactación, hasta la formación del blastocisto, el feto y de los tejidos extraembrionarios. Sin embargo, en embriones producidos por TNCS es frecuente observar aberraciones epigenéticas y por lo tanto transcriptómicas, que resultan en individuos que poseen cromosomas con telómeros acortados, perfiles anormales de las marcas de histonas y de la metilación del ADN, una elevada frecuencia de muerte pre- y perinatal, una alta incidencia de malformaciones, problemas metabólicos, deficiencias inmunológicas, entre otras alteraciones <sup>104,236,318</sup>. Estas anomalías suelen ocurrir durante el desarrollo embrionario en periodos pre- y post-implantatorios, afectando mecanismos celulares esenciales involucrados en la viabilidad celular, la activación del genoma embrionario, la inactivación del cromosoma X, el *imprinting* génico, la diferenciación celular y la formación de tejidos extraembrionarios <sup>104</sup>.

En numerosas especies de mamíferos, incluida la bovina, se han identificado regiones resistentes a ser reprogramadas en embriones en estadios pre- y post- implantatorios producidos por TNCS. Como resultado, regiones que están inactivas en el genoma de la célula donante no logran activarse en el futuro embrión, o por el contrario regiones que están activas en la célula somática no logran inactivarse durante el desarrollo embrionario. Estas regiones resistentes a ser reprogramadas han sido principalmente asociadas con la deposición de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3,



y H3K27me3, y con la metilación del ADN <sup>75,228,229,236,238,243,319,320</sup>. Por otro lado, si bien algunos embriones logran alcanzar el estadio de blastocisto, numerosos estudios han demostrado que éstos poseen alterados los perfiles de metilación del ADN, la distribución global de marcas de histonas, y la expresión tanto de genes codificantes como de no codificantes en comparación a embriones producidos por FIV <sup>226,236,245,321,322</sup>. Generalmente, estas diferencias epigenéticas y transcriptómicas han sido asociadas con una incorrecta reprogramación en las células que originan el trofotodermo <sup>245-249</sup>. Sin embargo, poco se conoce acerca del estado molecular de las células que componen el MCI de embriones producidos mediante las distintas biotecnologías reproductivas. Debido a que estudiar en profundidad las características moleculares del MCI es extremadamente complejo, en el presente trabajo propusimos utilizar a las células madre embrionarias para estudiar a nivel del MCI, el perfil transcriptómico y el estado epigenético de embriones producidos por FIV, TNCS y activación partenogenética.

Numerosas líneas de células madre embrionarias han sido establecidas a partir de embriones producidos por activación partenogenética en la especie murina <sup>323,324</sup>, humana <sup>325-328</sup> y porcina <sup>153</sup>; y a partir de embriones producidos por TNCS en murinos <sup>329-332</sup>, primates <sup>333,334</sup> y humanos <sup>229,335-338</sup>. Sin embargo, este es el primer reporte en el cual se han logrado derivar y caracterizar detalladamente líneas estables de células madre embrionarias bovinas a partir de estas fuentes embrionarias.

Durante el desarrollo del presente trabajo logramos obtener 9 líneas de células madre pluripotentes bovinas provenientes de embriones generados por TNCS (TNCS-CMEB), con una eficiencia del 29%, equivalente a la eficiencia obtenida para las CMEB derivadas a partir de embriones generados por FIV. En el caso de la derivación de CMEB a partir de embriones producidos por activación partenogenética, únicamente fue posible obtener 2 líneas a partir de partenotes diploides, aunque una de ellas se diferenció espontáneamente y no pudo ser mantenida a lo largo del cultivo *in vitro*. La eficiencia de derivación de líneas obtenidas a partir de embriones producidos por activación partenogenética fue de un 5%, significativamente menor a la eficiencia obtenida para las FIV-CMEB y TNCS-CMEB. Por el contrario, no pudimos obtener líneas derivadas a partir de partenotes haploides. En humanos y murinos, la obtención de líneas de células madre embrionarias a partir de embriones diploides y haploides producidos por activación partenogenética ronda entre aproximadamente el 50% y 30%, respectivamente <sup>327,328,339-341</sup>. Sin embargo, en el caso de la derivación de líneas haploides, frecuentemente ocurre una diploidización

espontánea durante la diferenciación celular o durante el cultivo prolongado *in vitro* <sup>323,339,341</sup>. El mecanismo por el cual ocurre esta diploidización aún no ha sido descrito, pero demuestra la inestabilidad genómica que exhiben estas células. Pese a que la eficiencia que observamos para la derivación de CMEB a partir de embriones producidos por activación partenogenética es menor a la reportada para la especie humana y murina, ésta es equivalente a la obtenida para la especie porcina donde únicamente 11 líneas pudieron ser establecidas a partir de 252 embriones (~4%) <sup>153</sup>. Sería interesante evaluar si la baja o nula eficiencia de derivación obtenida a partir de estas fuentes embrionarias, junto a la inestabilidad que reflejaron para poder ser mantenidas en cultivo, estarían asociadas a desbalances en el *imprinting* génico debido a la ausencia de la contribución del alelo paterno.

Al igual que las FIV-CMEB y que otras líneas de células madre embrionarias bovinas reportadas <sup>193</sup>, las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por TNCS o activación partenogenética pudieron ser cultivadas *in vitro* y formaron colonias planas con bordes irregulares, pudieron ser disociadas enzimáticamente, y mostraron una tasa de proliferación estable por más de 15 pasajes. Además, detectamos la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2, la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, y presentaron un cariotipo normal. Habiendo logrado obtener CMEB de las distintas fuentes embrionarias las cuales poseían características pluripotentes similares, decidimos avanzar con el estudio del transcriptoma y epigenoma de las mismas. Considerando que el cultivo *in vitro* de células de forma prolongada podría resultar en la homogenización del cultivo <sup>342</sup>, limitando la capacidad de poder detectar posibles diferencias entre las líneas celulares, realizamos todos los ensayos de caracterización molecular en el pasaje más bajo posible.

A partir del estudio del transcriptoma de genes codificantes, observamos que las CMEB derivadas a partir de todas las fuentes embrionarias poseían un perfil global de expresión semejante entre ellas y distinto al de los fibroblastos. Mediante el análisis de componentes principales observamos que las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por activación partenogenética, TNCS y FIV se agrupaban juntas y lejanas al grupo de las células somáticas. En los futuros ensayos no fue posible incluir a la línea derivada a partir de embriones producidos por activación partenogenética debido a la ausencia de réplicas biológicas.

Al estudiar la presencia de genes expresados diferencialmente entre las TNCS-CMEB y FIV-CMEB, encontramos la existencia de únicamente 46 genes diferencialmente expresados entre las

CMEB derivadas de las distintas fuentes embrionarias. Aquellos genes que se encontraban mayormente expresados en las TNCS-CMEB (n=7) no mostraron un enriquecimiento funcional, mientras que los genes que poseían mayor expresión en las FIV-CMEB (n=39) estaban relacionados con la organización de la matriz extracelular y el sistema inmune. Llamativamente, en un estudio realizado en la especie humana en el cual compararon el transcriptoma de células madre pluripotentes inducidas y células madre embrionarias derivadas de embriones FIV y TNCS, también observaron genes diferencialmente expresados asociados al sistema inmune <sup>343</sup>. Similarmente, ha sido reportado en murinos, caprinos y bovinos que crías nacidas producidas por TNCS suelen ser más propensas a sufrir enfermedades respiratorias o metabólicas, posiblemente debido a deficiencias inmunológicas <sup>344-346</sup>. Por otro lado, al comparar el perfil global de expresión en blastocistos obtenidos mediante FIV y TNCS, se observó que éstos últimos poseían una expresión alterada de genes asociados a la unión celular junto con genes ligados al cromosoma X y relacionados con el procesamiento del ARN, desarrollo embrionario, desarrollo del TE, modificaciones epigenéticas, y ARN no codificantes <sup>239,245,320-322,347</sup>. Considerando que en las TNCS-CMEB no observamos perfiles de expresión diferencial de genes que se encontraran relacionados con la mayoría de las funciones previamente mencionadas, creemos que esas alteraciones descritas podrían estar asociadas con otras subpoblaciones celulares presentes en el blastocisto como células del TE y el endodermo primitivo/ hipoblasto. Sin embargo, parecería que alteraciones ligadas a la organización de la matriz extracelular y/o unión celular y el sistema inmunológico estarían conservadas entre células madre embrionarias y blastocistos producidos por TNCS. Dado que la organización de la matriz extracelular y/o unión celular esta directamente involucrada con el proceso de diferenciación celular <sup>348</sup>, sería interesante evaluar si la expresión disminuida de estos genes en las TNCS-CMEB o en blastocistos podrían comprometer la correcta especificación de las células. Mas allá de estas pequeñas diferencias, en términos generales, el estudio del transcriptoma evidenció que las FIV-CMEB y TNCS-CMEB poseían un transcriptoma semejante dado que únicamente un 0,4% de los genes codificantes fueron diferencialmente expresados entre las células derivadas de las distintas fuentes embrionarias. Estos resultados coinciden con estudios análogos realizados en células madre embrionarias murinas y humanas donde observaron que éstas eran transcriptómica y funcionalmente equivalentes <sup>343,349-351</sup>. Al igual que el perfil de expresión, la distribución global de las marcas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 también fue similar entre las células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de

embriones producidos por FIV y TNCS. Las CMEB provenientes de ambas fuentes embrionarias exhibieron patrones epigenéticos similares entre ellas, y diferente al de las células somáticas. De hecho, a lo largo de todo el genoma (aproximadamente 3 giga bases) únicamente 1.694 regiones mostraron poseer señal diferencial de una o más de las tres marcas de histonas analizadas. Pese a la gran similitud entre el epigenoma de las líneas, observamos que la marca H3K9me3 era la que presentaba mayores diferencias entre las CMEB provenientes de distintas fuentes embrionarias. Esto mismo ha sido reportado para otras especies donde se observó que la marca H3K9me3 era responsable de impedir la correcta activación del genoma embrionario en embriones producidos por TNCS <sup>75,228,229</sup>.

En la presente tesis, observamos que las regiones genómicas que presentaban una señal diferencial de la marca H3K9me3 correspondían a regiones intergénicas, y en el caso de las TNCS-CMEB, estas regiones se encontraban enriquecidas por los motivos de secuencia *Gata3*, *p53* y *E-box*. En embriones humanos, bovinos y murinos, el factor de transcripción GATA3 ha sido relacionado con la determinación del TE, mientras que la expresión de P53 suele inducirse cuando ocurre daño en el ADN o durante la apoptosis, y actúa suprimiendo la expresión de *Nanog* <sup>352-358</sup>. Si bien las células madre embrionarias cultivadas *in vitro* ya no poseen la capacidad de originar derivados extraembrionarios, considerando un contexto fisiológico, durante el desarrollo embrionario la deposición de esta marca podría impedir que estos factores se unan a sus regiones blanco, afectando la especificación celular como por ejemplo la especificación del trofoblasto. De hecho, se ha reportado que embriones producidos por TNCS suelen presentar una expresión disminuida de genes asociados con el desarrollo del TE junto con un desarrollo anormal de la placenta, entre otros tejidos extraembrionarios <sup>245-249</sup>. Queda pendiente esclarecer el rol que podría tener la marca H3K9me3 en las TNCS-CMEB, aunque es necesario aclarar que estas regiones diferencialmente marcadas por H3K9me3 (e incluso las otras marcas de histonas analizadas) no parecieran impactar directamente sobre la expresión génica de las TNCS-CMEB.

Por otro lado, al analizar si existía alguna correlación entre las regiones con distinta señal de alguna de las marcas de histona y los genes diferencialmente expresados, observamos que éstos estaban uniformemente distribuidos a lo largo de todo el genoma, sin que se notara alguna asociación entre los mismos. Llamativamente, la mayoría de los genes que poseían mayor expresión en las FIV-CMEB, eran producto de la deposición de la marca H3K4me3 la cual, en algunos casos, también estaba presente en las células somáticas en esas mismas regiones, y ausente en las TNCS-CMEB.

En línea con lo planteado anteriormente, esto indicaría que, dado que en algunos casos esta marca estaba presente tanto en las FIV-CMEB como en las células somáticas, la ausencia de esta marca en las TNCS-CMEB no sería producto de la memoria epigenética, sino que podría haber ocurrido de forma estocástica.

Al igual que lo observado en células madre pluripotentes de la especie murina y humana <sup>343,349-351</sup>, a grandes rasgos no encontramos diferencias en el transcriptoma y epigenoma (considerando las tres marcas de histonas analizadas) para las TNCS-CMEB y FIV-CMEB. Sin embargo, como último análisis decidimos estudiar y comparar el estado de la cromatina de los promotores de las CMEB derivadas a partir de las distintas fuentes embrionarias para determinar si las líneas TNCS-CMEB presentaban cierta tendencia o *priming* a diferenciarse con mayor probabilidad a alguno de los linajes embrionarios, en comparación a las FIV-CMEB. Con ese fin, definimos 8 estados de la cromatina a lo largo de todo el genoma en ambas fuentes de CMEB y en los fibroblastos, teniendo en cuenta las distintas combinaciones e intensidad de señal de las marcas de histonas analizadas. Observamos que los 8 estados definidos estaban representados a lo largo de todo el genoma de las CMEB y de las células somáticas. Focalizándonos específicamente en las regiones promotoras, no observamos diferencias en el estado de la cromatina entre las FIV-CMEB y las TNCS-CMEB. Las TNCS-CMEB conservaban un estado de la cromatina en sus promotores similar al de las FIV-CMEB, pero diferente al de las células somáticas. De acuerdo con el estado pluripotente de las células <sup>263,359,360</sup>, los promotores de genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia celular como *Nanog*, poseían un estado de la cromatina activo (enriquecido en H3K4me3) en ambas CMEB, e inactivo en los fibroblastos; mientras que promotores de genes relacionados con la determinación del destino celular exhibieron un estado de la cromatina bivalente en ambas CMEB. De esta forma, debido a la alta similitud encontrada entre las líneas TNCS-CMEB y FIV-CMEB en el estado de la cromatina de los promotores y en conjunto con los ensayos previamente realizados, consideramos que las TNCS-CMEB deberían exhibir un comportamiento similar al de las FIV-CMEB a la hora de evaluar el potencial de diferenciación.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que, al menos para las regiones codificantes y para las tres marcas de histonas analizadas, las TNCS-CMEB poseen un transcriptoma y epigenoma semejante al de las FIV-CMEB, lo que indicaría que el MCI de los embriones producidos por TNCS se reprogramó correctamente y sería equivalente al MCI de embriones producidos por FIV. Consideramos que las pequeñas diferencias detectadas entre las líneas pueden

ser de naturaleza estocástica debido a las técnicas utilizadas, o pueden ser producto de la variabilidad genética que existía entre las líneas, factor que ha sido responsable de aportar discrepancias transcriptómicas y epigenómicas entre diferentes líneas de células madre pluripotentes <sup>361-363</sup>. Sin embargo, no podemos afirmar que este mismo patrón se repita a la hora de analizar otros componentes epigenéticos como la transcripción de regiones no codificantes, la metilación del ADN, o al analizar otras marcas de histonas (por ej. la H3K4ac) los cuales también se sabe que cumplen un rol esencial durante la reprogramación y determinación del destino celular <sup>104</sup>. De hecho, es importante destacar que una gran proporción del genoma fue clasificado como “cromatina quiescente”, evidenciando que las marcas estudiadas no modificaban esas regiones, sino que podría haber otras marcas que las regulen. Por otra parte, es necesario considerar que, en el presente trabajo, las líneas TNCS-CMEB fueron generadas a partir de una única línea celular de fibroblastos fetales con el fin de disminuir la variabilidad genética entre las líneas. Dado que ha sido demostrado que el grado de reprogramación logrado podría verse afectado por el genotipo, el estado de diferenciación y la edad de las células utilizadas como donantes nucleares durante la técnica de TNCS <sup>364</sup>, serán necesarios futuros estudios para corroborar que los resultados obtenidos durante esta tesis puedan ser extrapolados a otros tipos celulares.

Existen diferentes razones que podrían explicar las similitudes encontradas entre las FIV-CMEB y TNCS-CMEB. Por un lado consideramos que una vez superada la barrera de la activación del genoma embrionario, las alteraciones moleculares podrían estar restringidas a poblaciones celulares que dan origen a tejidos extraembrionarios como el TE, los cuales han sido excluidos de este análisis y, como fue mencionado anteriormente, suelen poseer alteraciones en embriones producidos por TNCS <sup>245-249</sup>. Recientemente, células madre de trofoblasto han sido derivadas a partir de blastocistos bovinos utilizando un agonista de la vía de señalización de Wnt <sup>214</sup>. Sería interesante realizar los ensayos llevados a cabo durante esta tesis en células madre de trofoblasto bovinas derivadas a partir de embriones producidos por FIV y TNCS, con el fin de identificar la presencia de posibles regiones genómicas incorrectamente reprogramadas y de esta forma, poder controlar los eventos estocásticos que ocurren durante la reprogramación con el fin de mejorar la eficiencia de la técnica de TNCS. Por otro lado, existe la posibilidad de que únicamente aquellos embriones que hayan reprogramado correctamente su genoma y hayan alcanzado el estadio de blastocisto sean capaces de dar origen a una línea de células madre embrionarias. De esta forma, consideramos que estas células (correctamente reprogramadas) podrían ser utilizadas como célula

donante en una nueva ronda de transferencia nuclear, lo cual resultaría en preñeces normales con mejor eficiencia de crías nacidas vivas. De hecho, en la especie murina, se ha demostrado que utilizar células madre embrionarias como donantes nucleares durante la técnica de TNCS, mejora la cantidad de embriones que llegan a término <sup>365</sup>. Por otro lado, sería interesante analizar las características moleculares que posee cada célula que conforma a un embrión en estadios tempranos del desarrollo y previo a que ocurra la especificación del linaje con el fin de lograr predecir si los precursores de cada linaje celular poseen un perfil transcriptómico y epigenómico acorde a su identidad, y si éste, es similar entre las distintas fuentes embrionarias. Consideramos que con el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten estudiar el perfil molecular en células individuales, estos estudios podrán ser realizados en un futuro cercano y nos permitirán predecir si un embrión logrará establecer una línea de CMEB y/o una preñez viable.

En conclusión, durante el presente trabajo de tesis encontramos condiciones de cultivo simples y químicamente definidas que nos permitieron derivar y expandir líneas de células madre embrionarias bovinas por extendidos períodos de tiempo conservando su morfología, tasa proliferativa, cariotipo estable, expresión de los marcadores de pluripotencia y potencial de diferenciación. Además, una vez establecidas las líneas, éstas pudieron ser expandidas utilizando la matriz Vitronectina en presencia de Activina A. Estas condiciones de cultivo simplificadas nos permitieron aportar información acerca del programa de pluripotencia bovino, demostrando que las CMEB dependen de la inactivación de la vía de señalización de Wnt y de la presencia de la Activina A y FGF2 para mantener su auto-renovación y pluripotencia, lo cual coincide con el estado de pluripotencia *primed*.

Por otra parte, pudimos derivar líneas de CMEB a partir de blastocistos individuales producidos por distintas técnicas de biotecnologías reproductivas incluyendo FIV, TNCS y activación partenogenética. Si bien las líneas producidas a partir de embriones obtenidos por activación partenogenética arrojaron una baja eficiencia de establecimiento, las líneas derivadas a partir de embriones FIV y TNCS pudieron establecerse con una eficiencia equivalente de un 29%. Para todas las fuentes embrionarias, las líneas obtenidas mostraron una morfología de crecimiento en colonias planas con bordes irregulares, toleraron la disociación enzimática, poseían una alta tasa proliferativa, mantuvieron un cariotipo normal de 60 cromosomas, y expresaron homogéneamente los marcadores de pluripotencia.

Al comparar el transcriptoma y epigenoma de las líneas FIV-CMEB y TNCS-CMEB, encontramos únicamente un 0,4% de genes diferencialmente expresados entre ellas, y 1694 (de 3gb) regiones diferencialmente marcadas por las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3. Sin embargo, estas diferencias no fueron asociadas a ninguna función celular relevante, no fueron detectadas en regiones cercanas a genes importantes para el desarrollo, y se encontraban distribuidas de forma aleatoria por todo el genoma. Finalmente, mediante la categorización de la cromatina, detectamos que ambas líneas de células madre embrionarias bovinas compartían las mismas características en el estado de la cromatina de sus promotores. De esta forma, concluimos que para las regiones codificantes y las tres marcas de histonas analizadas, las TNCS-CMEB son transcriptómica y epigenómicamente equivalentes a las FIV-CMEB, indicando que, en bovinos, las células presentes en el macizo celular de ambas fuentes embrionarias serían semejantes y no serían las responsables de las alteraciones frecuentemente observadas en los embriones producidos por TNCS.



## ○ **Materiales y métodos**

### **6.1: Obtención de fibroblastos fetales bovinos.**

Para la obtención de fibroblastos fetales bovinos se utilizaron fetos de aproximadamente 2-3 meses de edad gestacional provenientes de animales faenados en un frigorífico local. Los fetos fueron transportados a temperatura ambiente en solución fisiológica suplementada con 100 mg/L de estreptomycin sulfato (Sigma, #S9137). Una vez en el laboratorio, se procedió a lavar numerosas veces a los fetos con solución fisiológica y antibiótico con el fin de remover la sangre y posibles contaminantes. Bajo cabina de bioseguridad, se removió la cabeza y los órganos internos, mientras que los tejidos restantes fueron procesados. Para el procesamiento, los tejidos fueron lavados en DPBS (del inglés “*Dulbecco Phosphate Buffered Saline*”, pH 7,4, 8 mg NaCl, 200 mg KCl, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1,14 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por litro de solución) y digeridos mecánicamente utilizando hojas de bisturí y luego, digeridos enzimáticamente con una solución de 0,25% Tripsina/EDTA (Gibco, #25200072) durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la digestión enzimática, el procesado fue colocado en un tubo cónico de 50 mL con 30 mL de medio DMEM alta glucosa (Gibco, #11965118) suplementado con 10% v/v de SFB (Gibco, #26140079), 2 mM de L-Glutamina (Gibco, #25030081), 1% v/v de MEM NEAA (del inglés “*Minimum Essential Medium Non Essential Amino Acids*”, Gibco, 11140050), 100 U/mL de Penicilina/Estreptomycin (Gibco, #15070063) y 50 µg/mL de Nystatina (Sigma, #N6261), y se lo dejó decantar por 10 minutos. Se recuperó luego el sobrenadante y se lo sembró en botellas de T75 utilizando el medio de cultivo DMEM previamente descrito (siendo este el P0). Las células fueron incubadas por aproximadamente 4-5 días a 38,5 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 90% de confluencia. El medio de cultivo fue renovado cada 2 días. Una vez confluentes las células fueron criopreservadas y/o sub-cultivadas para continuar su cultivo (6.3).

### **6.2: Obtención de fibroblastos embrionarios murinos.**

Los fibroblastos embrionarios murinos fueron obtenidos a partir de embriones murinos provenientes de hembras preñadas de la cepa CF1 con 12-14 días de gestación (Bioterio del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde”, IIBIO). Se comenzó por practicar la eutanasia de las hembras por dislocación cervical. Luego, en la cabina de bioseguridad, se higienizó el abdomen con 70% v/v de etanol y se abrió la cavidad peritoneal para obtener los cuernos uterinos, tejido donde se encontraban los fetos. Los cuernos uterinos fueron lavados

múltiples veces con DPBS para eliminar la sangre y se removieron las placentas y membranas fetales. Con la ayuda de una lupa estereoscópica, se removió la cabeza y las vísceras de los fetos y luego los cuerpos fueron disgregados de forma mecánica y enzimática utilizando hojas de bisturí y una solución de 0,25% Tripsina/EDTA durante 30 minutos a 37 °C. Una vez disgregados, los procesados fueron colocados en un tubo cónico de 50 mL con 30 mL de medio DMEM alta glucosa suplementado con 10% v/v de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 1% v/v de MEM NEAA, 100 U/mL de Penicilina/Estreptomicina, y se los dejó decantar por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se lo dividió en X botellas de T75, siendo X igual al número de fetos obtenidos dividido 3 (P0). Se completó el volumen de la botella con el medio de cultivo DMEM previamente descrito. Las células fueron incubadas por aproximadamente 4-5 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 90% de confluencia. El medio de cultivo fue renovado cada 2 días. Una vez confluentes las células fueron criopreservadas y/o sub-cultivadas para continuar su cultivo (6.3).

### **6.3: Criopreservación y sub-cultivo de las células somáticas.**

Los fibroblastos bovinos y murinos fueron cultivados en el medio DMEM previamente descrito (6.1 y 6.2). Una vez confluentes, el medio de cultivo fue removido, se realizó un lavado con DPBS y luego se colocaron 3 mL de Tripsina/EDTA y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. Una vez que las células fueron desprendidas de la superficie de la botella de cultivo, se agregaron 6 mL de medio DMEM con 10 % v/v de SFB para inactivar la reacción enzimática. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 mL y centrifugado por 5 minutos a 300 g. Se descartó el sobrenadante, y el *pellet* fue resuspendido en el medio DMEM previamente descrito. En cuanto a los fibroblastos embrionarios murinos, éstos fueron amplificados en una relación 1:3 y cultivados por 4-5 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta que alcanzaran el pasaje 3, pasaje en el cual las células fueron irradiadas (6.4). En cuanto a los fibroblastos fetales bovinos, únicamente 1/3 del cultivo fue mantenido en cultivo a 38,5 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar el pasaje 2 o 3, mientras que los 2/3 restantes fueron criopreservados en P0.

Para la criopreservación, las células fueron desprendidas de la superficie de la botella de cultivo utilizando Tripsina/EDTA por 5 minutos a 37 °C, resuspendidas en medio DMEM con 10% v/v de SFB y centrifugada por 5 minutos a 300 g. El *pellet* fue resuspendido lentamente en medio de criopreservación el cual consistía en medio DMEM alta glucosa suplementado con 20% v/v de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 1% v/v de MEM NEAA, 100 U/mL de Penicilina/Estreptomicina y

10% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, #D2650). La suspensión celular fue fraccionada en criotubos y los cuales fueron colocados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un contenedor que contenía isopropanol (Mr. Frosty) para que la temperatura disminuyera controladamente de a  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Luego de 24 h, los criotubos fueron transferidos a un tanque con nitrógeno líquido ( $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en donde fueron almacenados indefinidamente. Para descongelar las células, los criotubos fueron removidos del nitrógeno líquido y calentados en un baño térmico a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se transfirió el contenido del criotubo a un tubo cónico de 15 mL que contenía 6 mL de medio DMEM con 10% v/v de SFB, se centrifugó por 5 minutos a 300 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en el medio DMEM previamente descrito, colocando el volumen correspondiente a la superficie de cultivo que se iba a utilizar para su cultivo en la incubadora con 5%  $\text{CO}_2$ .

#### **6.4: Irradiación y viabilidad de los fibroblastos embrionarios murinos.**

Para poder utilizar a los fibroblastos embrionarios murinos como capa nutricia, éstos fueron sometidos a irradiación gamma con el fin de inactivarlos mitóticamente sin afectar su viabilidad. Para ello, se removió el medio de cultivo de las botellas de T75, se hizo un lavado con DPBS, se agregaron 2 mL de Tripsina/EDTA y se incubó durante 5 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para desprender a las células de la superficie de cultivo. Para recuperar la totalidad de las células, se utilizó un *scraper* para ayudar a desprender a las células del plástico. El contenido celular fue resuspendido en 6 mL de medio DMEM con 10% v/v de SFB y suplementos, y transferido a un tubo cónico de 50 mL. La suspensión celular fue homogeneizada con una seropipeta de 5 mL para evitar la presencia de agregados celulares. El tubo cónico que contenía las células fue transportado hasta la empresa CEBIRSA S.A (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) donde se realizó la irradiación con parámetros de 8000 rads. Una vez irradiados y en el laboratorio, las células fueron centrifugadas por 10 minutos a 300 g. El *pellet* fue resuspendido en medio DMEM con 10% v/v de SFB y suplementos, y se determinó la concentración y viabilidad celular. La concentración celular fue determinada utilizando un hemocitómetro. Para determinar la viabilidad luego de la irradiación, una alícuota de  $10\text{ }\mu\text{L}$  de células fue incubada por 5 minutos en presencia del colorante *Trypan Blue*. Luego, utilizando un hemocitómetro se cuantificó la cantidad de células en las cuales había ingresado el colorante azul (células muertas) sobre el total de células, y se calculó el porcentaje de viabilidad. Finalmente, los fibroblastos embrionarios murinos irradiados fueron

criopreservados en una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL y conservados en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

### **6.5: Preparación de los iMEF como capa nutricia.**

Los iMEF fueron utilizados para formular medio condicionado o como capa nutricia durante el cultivo de las células madre embrionarias bovinas. En ambos casos, los iMEF fueron descongelados al menos 24 horas previas a su uso, y sembrados en una placa de cultivo la cual fue previamente tratada durante una 1 hora con una solución estéril de 0,1% v/v de gelatina bovina (Sigma, #G9391) a temperatura ambiente. Se sembraron  $2 \times 10^6$  células/mL cada aproximadamente 50 cm<sup>2</sup> de superficie utilizando el medio DMEM con 10% v/v de SFB y suplementos. Luego, las placas fueron agitadas múltiples veces en movimientos de cruz para lograr una distribución uniforme de las células, y cultivadas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Los iMEF fueron mantenidos en cultivo durante 10 días como máximo.

Para la utilización de los iMEF como capa nutricia, una hora antes del sembrado de las células madre, el medio DMEM fue removido, se realizaron dos lavados con DPBS y se colocó el medio de cultivo correspondiente al cultivo de las células madre. En cuanto al medio condicionado, el medio DMEM fue removido, se realizaron dos lavados con DPBS y se colocó el medio NBFR (6.11). Se procedió a recolectar y refrigerar el medio condicionado a las 24, 48 y 72 h. Luego de 72 h, los iMEF fueron descartados. Debido a la rápida degradación del FGF2, al momento de la utilización del medio condicionado, el mismo fue suplementado con 20 ng/mL del factor (Preprotech, #100-18B).

### **6.6: Producción de embriones mediante fecundación *in vitro*.**

Se comenzó por realizar la maduración *in vitro* de oocitos recolectados de ovarios provenientes de animales faenados. Los ovarios fueron transportados en una conservadora con solución fisiológica suplementada con 100 mg/L de estreptomycin sulfato a 20-25 °C. Una vez en el laboratorio, se eliminaron los restos de cuernos uterinos y/o ligamentos de los ovarios y se los lavó múltiples veces con solución fisiológica suplementada con antibiótico para eliminar la sangre y posibles contaminantes. Una vez acondicionados, los ovarios fueron conservados en un baño térmico de 38,5 °C hasta ser procesados. Utilizando una aguja de 21 G acoplada a una jeringa de 10 mL se realizó la aspiración folicular de folículos de 2-10 mm de diámetro. El fluido folicular recolectado fue depositado en un tubo cónico de 50 mL en posición vertical que se encontraba en

un baño térmico a 38,5 °C. Finalizada la punción folicular, se dejó reposar al tubo cónico por 10 minutos a 38,5 °C para permitir que los complejos oocitos-células del cúmulus (COCs) decanten. Luego, utilizando una pipeta *Pasteur* se recolectó el *pellet*, se lo colocó en una placa de búsqueda y bajo una lupa estereoscópica, se seleccionaron aquellos COCs que tuvieran 3 o más capas de células del cúmulus y un citoplasma homogéneo (calidad 1). Los COCs seleccionados fueron lavados en dos placas de 35 mm con 3 mL de medio de lavado previamente atemperado que consistía en medio TCM-199 con sales de Hanks (Gibco, #12350-039), 1 mg/mL de BSA (Sigma, #A6003) y 5 µg/mL de gentamicina. A continuación, se realizó un lavado en medio de maduración previamente atemperado y equilibrado y se colocaron hasta 50 COCs por cada pocillo de placa de 4 pocillos (NUNC, USA) que contenía 500 µL de medio de maduración BO-IVM (IVF BioScience) y se los incubó durante 22-24 h a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de 22-24 h, los COCs con el cúmulus expandido fueron lavados en 3 gotas de medio de FIV previamente atemperado y equilibrado, y colocados de a grupos de máximo 50 COCs por pocillo de la placa de 4 pocillos que contenía 400 µL de medio BO-IVF (IVF BioScience). Se continuó por preparar el semen. Se utilizó semen congelado en pajuelas de 0,5 mm de la raza Holstein. Las pajuelas fueron extraídas del tanque de nitrógeno líquido y sumergidas en un baño térmico de 37 °C durante 1 minuto. Luego, los espermatozoides fueron lavados 2 veces en medio de lavado de espermatozoides BO-SEMEN (IVF BioScience). Para ello, el contenido de la pajuela fue depositado en un tubo cónico de 15 mL que contenía 3 mL de medio BO-SEMEN previamente atemperado y se centrifugó por 5 minutos a 300 g. Una vez lavados, el *pellet* que contenía espermatozoides vivos, muertos, mótils y no mótils, fue resuspendido en 200 µL de medio BO-IVF y se determinó la motilidad progresiva bajo un microscopio de campo claro y la concentración espermática utilizando un hemocitómetro. Se utilizó una dosis inseminante de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL. La FIV fue realizada por 19-22 h a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Concluida la fecundación, se procedió con el cultivo embrionario *in vitro*. Con este fin, el primer paso consistió en eliminar las células del cúmulus de los presuntos cigotos, utilizando un vortex a velocidad intermedia por 2 minutos. El tubo fue lavado múltiples veces para recuperar la totalidad de los presuntos cigotos. Finalmente, los presuntos cigotos fueron lavados en 3 gotas de medio de cultivo embrionario BO-IVC (IVF BioScience) previamente atemperado y equilibrado, y colocados de a grupos de máximo 50 presuntos cigotos por pocillo de placa de 4 pocillos que contenía 500 µL de medio BO-IVC cubierto con 400 µL de aceite (Vitrolife, #10029) durante 8 días a 38,5 °C, 5%

CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. La tasa de blastocistos y blastocistos eclosionados fue evaluada luego de 7 u 8 días de cultivo.

### **6.7: Producción de embriones diploides y haploides mediante activación partenogenética.**

Para producir embriones diploides mediante activación partenogenética, se utilizó ionomicina y 6-DMAP para evitar la liberación del corpúsculo polar, mientras que en el caso de la producción de embriones haploides se utilizó ionomicina y cicloheximida para promover la liberación del corpúsculo polar. La ionomicina es un ionóforo de calcio que produce la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático, mientras que el 6-DMAP y la cicloheximida actúan inhibiendo la síntesis de proteínas quinasas o inhibiendo la síntesis proteica, respectivamente, disminuyendo de esta forma los niveles del factor promotor de la maduración.

En ambas activaciones, los oocitos fueron recolectados a partir de animales de faena y madurados *in vitro* como se detalla en el inciso 6.6. Luego de 22-24 h de maduración, se determinó la maduración nuclear. Para ello, se removieron las células del cúmulus utilizando una solución de 1 mg/mL de la enzima hialuronidasa (Sigma, #4272) en TCM-199 Hanks y se visualizó la presencia del primer corpúsculo polar bajo lupa estereoscópica. Para la producción de embriones diploides y haploides, los oocitos maduros fueron incubados en una solución de 5 µM de ionomicina (Sigma, #407952) en medio TCM-199 con sales de Hanks suplementado con 1% de BSA por 4 minutos en oscuridad a 38,5 °C. Luego, los oocitos fueron lavados en 6 gotas de medio TCM-199 con sales de Hanks y BSA, y finalmente en 1 gota del medio de cultivo embrionario. A continuación, éstos fueron incubados durante 4 horas en 2 mM de 6-DMAP (Sigma, #D2629) en medio BO-IVC, o durante 6 horas en 10 µg/mL de cicloheximida (Sigma, #C7698) en BO-IVC a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub> para promover la activación partenogenética diploide o haploide, respectivamente. Una vez activados, éstos fueron lavados en 6 gotas de medio TCM-199 con sales de Hanks y BSA, y en 1 gota del medio BO-IVC y cultivados en medio BO-IVC cubierto con aceite durante 7-8 días a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> hasta obtener blastocistos o blastocistos eclosionados.

### **6.8: Producción de embriones por transferencia nuclear de células somáticas.**

Para la producción de embriones a través de la técnica de TNCS, se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia Eclipse Ti Nikon (TK, Japón) que tenía acoplado micromanipuladores

hidráulicos NT88 Narishige (TK, Japón). La succión y presión positiva fueron controladas por un sistema de microinyección VARIO *Oil* (Eppendorf, Mu, Alemania) y un microinyector de sostén VARIO *Air* (Eppendorf, Mu, Alemania). Se utilizaron micropipetas comerciales (VetroLife Inc, USA) de diámetro externo de 180  $\mu\text{m}$  (micropipeta sostén) y de 15-18  $\mu\text{m}$  con un ángulo de 35° (micropipeta de enucleación y transferencia). La maniobra de micromanipulación fue llevada a cabo a 38,5 °C. La placa de micromanipulación consistió en una placa de 60 mm (Corning, USA) donde se colocaron 4 gotas de 150  $\mu\text{L}$  de medio de lavado TCM-199 con sales de Hanks suplementado con 10% de SFB (H199-SFB); y 2 gotas de 150  $\mu\text{L}$  de H199-SFB suplementado con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Citocalasina B (Sigma, #C6762) (H199-SFB-CB). Toda la placa fue cubierta con aceite mineral (Sigma, #M5310).

El día previo a la micromanipulación, se recolectaron y maduraron oocitos como se detalla en el inciso 6.6. Luego de la maduración, las células del cúmulus fueron eliminadas y se seleccionaron aquellos oocitos maduros mediante la visualización del primer corpúsculo polar. Los oocitos maduros fueron colocados en un pocillo que contenía 500  $\mu\text{L}$  de H199-SFB cubierto con 400  $\mu\text{L}$  de aceite. Se tomaron grupos de 10 oocitos y se los colocó durante 7 minutos en un pocillo que contenía 500  $\mu\text{L}$  de H199-SFB, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Citocalasina B y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Hoescht 33342 para desestabilizar el citoesqueleto y teñir su ADN, respectivamente. Luego, se los lavó en H199-SFB y se los colocó en la gota de H199-SFB-CB de la placa de micromanipulación. Utilizando un sistema de epifluorescencia Nikon controlado por un obturador automático Uniblitz (Cop, Dinamarca), se realizaron breves exposiciones a la luz ultravioleta (<5 segundos) para remover por aspiración los cromosomas y el primer corpúsculo polar. Se intentó remover menos del 30% del ooplasma. Una vez removido el material genético, la micropipeta fue expuesta a la luz ultravioleta para corroborar la correcta enucleación. Una vez finalizado este paso, se realizó la transferencia de la célula donante de material genético. Las células utilizadas fueron fibroblastos fetales cutáneos de un macho de raza sintética en un pasaje menor al pasaje 8 las cuales fueron previamente sincronizadas en el estadio G0/G1 del ciclo celular mediante su cultivo durante 72 h en medio DMEM alta glucosa, 0,5% de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 1% v/v de MEM NEAA y 100 U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Al momento de la transferencia, las células fueron desprendidas de la superficie de cultivo utilizando 0,25% de Tripsina-EDTA, resuspendidas en H199-SFB, y colocadas junto a los oocitos enucleados en la gota de H199-SFB de la placa de micromanipulación. Las células fueron tomadas con la aguja de transferencia y colocadas en el



espacio perivitelino del oocito enucleado. Posteriormente, se tomaron grupos de 5 oocitos y se los colocó en la cámara de fusión en presencia del medio de fusión [Agua ultrapura (Sigma, #W1503), 0,28M manitol (Sigma, #9546), 0,1mM MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O (Sigma, #63138), 0,5mM Hepes, 0,05% v/v BSA]. Los oocitos fueron posicionados ubicando a la célula en posición perpendicular a los electrodos y se aplicaron dos pulsos de 1,8 kV/cm<sup>2</sup> por 35 μs utilizando un electro fusor (BTX 830, Harvard Apparatus). Luego los oocitos fueron recuperados durante 1 h en medio BO-IVC suplementado con 10% de SFB a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Los oocitos fusionados fueron activados químicamente utilizando ionomicina y 6-DMAP mientras que aquellos oocitos no fusionados fueron descartados. El cultivo *in vitro* de los embriones fue llevado a cabo durante 7-8 días en medio BO-IVC cubierto por aceite a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>.

### **6.9: Aislamiento del macizo celular interno mediante inmuno-cirugía.**

El aislamiento del macizo celular interno fue realizado a partir de blastocistos sin zona pelúcida por inmuno-cirugía. Se comenzó por tratar a aquellos blastocistos no eclosionados durante 1-2 minutos a 38,5 °C con una solución de 10 μg/mL de Pronasa (Sigma, #10165921001) en H199 para disgregar la zona pelúcida. Luego, los embriones fueron lavados exhaustivamente en 10 gotas de H199 con el fin de remover posibles remanentes de la enzima. A continuación, se realizó la inmuno-cirugía incubando a los embriones en presencia de 20% de anti-suero bovino (Sigma, #B8270) por 1 h a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los embriones fueron lavados múltiples veces en H199 e incubados en 20% de suero complementario de cobayo (Sigma, #S1639) por 1 h a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, los embriones fueron lavados en 10 gotas de H199, aspirando y expulsando el medio para que la acción mecánica concluya con la remoción de las células del trofotodermo.

### **6.10: Sustitución del medio CTFR por los medios E6, N2B27 y mTeSR Plus.**

Las líneas de células madre embrionarias bovinas obtenidas previamente en condiciones CTFR fueron cultivadas sobre una monocopa de iMEF en el medio CTFR suplementado con 20 ng/mL de FGF2 y 2,5 μM del inhibidor IWR1 (Sigma, #I0161) a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Dos líneas CTFR-CMEB independientes fueron cultivadas por 4-6 pasajes en los medios E6 (StemCells Technologies, #05947), mTeSR Plus (StemCells Technologies, #05825) o N2B27. El medio N2B27 consistía en una mezcla en relación 1:1 del medio DMEM F12 (Gibco, #11320-033) y Neurobasal (Gibco, #21103-049), suplementado con 0,5% v/v del suplemento N2 (Gibco, #17502-

048), 1% v/v del suplemento B27 (Gibco, #17504-044), 1% de MEM NEAA, 1% v/v de Glutamax, 0,1 mM de 2-Mercaptoetanol (Sigma, #M6250) y 100 U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Los 3 medios experimentales fueron suplementados con 2,5  $\mu$ M de IWR1 y 20 ng/mL de FGF2 (excepto el mTeSR Plus que ya poseía FGF2 en su formulación). Dependiendo del experimento, los medios E6 y N2B27 fueron además suplementados con 0,1%, 0,5% o 1% m/v de BSA baja en ácidos grasos (MP Biomedicals NZ, #0219989950) o con 5% o 10% v/v de KSR (Gibco, 10828-028). Durante la primera semana de adaptación, las células fueron cultivadas en una mezcla en relación 1:1 del medio CTFR y los medios experimentales. Finalmente, el medio CTFR fue totalmente reemplazado. Los medios de cultivo fueron cambiados diariamente.

### **6.11: Derivación y cultivo de las líneas NBFR-CMEB y TPFR-CMEB.**

Para la derivación de líneas de células madre embrionarias bovinas se utilizaron MCI aislados por inmuno-cirugía (6.9) o blastocistos sin zona pelúcida de día 7-8 de desarrollo producidos por FIV, TNCS o activación partenogénica. Blastocistos o MCI de forma individual, o grupos de 3-4 blastocistos fueron colocados en una placa de 48 o 4 pocillos, respectivamente, las cuales estaban cubiertas por una monocapa de iMEF; y se los cultivó en medio NBFR [medio N2B27, 1% de BSA, 20 ng/mL de FGF2, 2,5  $\mu$ M de IWR1] o TPFR [medio mTeSR Plus (que contiene FGF2) y 2,5  $\mu$ M de IWR1] a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Durante el pasaje cero, ambos medios fueron suplementados con 10  $\mu$ M del inhibidor de la quinasa Rho (Rocki, Enzo, #ALX-270-333), 1% v/v de la solución antibiótico/ antimicótico (JR Scientific, #20004) y 2,5 mg/mL de Plasmocin (Invivo Gen, #ant-mpp). Luego de 24 h, aquellos blastocistos/MCI que no lograron adherirse a la monocapa de los iMEF fueron presionados contra el fondo del pocillo utilizando una aguja de 22 G para forzar la adherencia. Al día siguiente, aquellos blastocistos/MCI que fallaron en adherirse fueron descartados. A partir de ese momento, el medio de cultivo fue reemplazado diariamente. Durante las primeras 3 o 4 semanas, la totalidad del cultivo fue disgregado enzimáticamente y sembrado sobre iMEF nueva cada 5-7 días. Para ello, el medio de cultivo fue removido, se lavó el pocillo con 250  $\mu$ L de DPBS (Gibco, #14190250), se agregaron 125  $\mu$ L de Tryple Express (Gibco, #12604-013) y se incubó durante 3 minutos a 37 °C. Luego, con ayuda de pipeteo mecánico suave, se terminaron de disociar las células, las cuales fueron colocadas en un tubo *Eppendorf* con 1 mL de DPBS para ser centrifugadas por 5 minutos a 300 g. El *pellet* fue resuspendido en 250  $\mu$ L de medio y sembrado en un pocillo de placa de 48 pocillos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego de cada pasaje,

el medio de cultivo fue suplementado con 10  $\mu$ M de Rocki durante las primeras 24 h para incrementar la supervivencia celular. Alcanzado el pasaje 3 o 4, se esperó observar la formación de colonias compactas, momento en el cual se consideró que la línea celular había sido establecida. Si luego del quinto pasaje no se lograban observar colonias, el pocillo era descartado. Una vez establecidas, cada 3-4 días en cultivo las líneas alcanzaban un 80% de confluencia momento en el cual las células fueron amplificadas en una relación 1:5 o 1:10 dependiendo de la línea celular. Para el cultivo extendido *in vitro* (>P20) se agregaron 20 ng/mL de Activina A (R&D Systems, #338-AC) en la formulación del medio.

### **6.12: Cultivo de las células madre embrionarias bovinas en ausencia de iMEF.**

Las líneas de células madre embrionarias bovinas fueron cultivadas utilizando su respectivo medio de cultivo sobre los iMEF hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Luego, las células fueron disgregadas de los iMEF y la totalidad del cultivo fue sembrado sobre Vitronectina (Gibco, #A14700) o Matrigel (Sigma, #E1270). Según el experimento, el medio de cultivo fue suplementado con 20 ng/mL de Activina A. Durante las primeras 24 h, el medio de cultivo fue suplementado con 10  $\mu$ M de Rocki. El medio de cultivo fue cambiado diariamente. Las células fueron cultivadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 3-4 días hasta alcanzar un 80% de confluencia, momento en el cual las células fueron amplificadas en una relación 1:5 o 1:10 dependiendo de la línea celular.

### **6.13: Derivación y cultivo de las células madre embrionarias bovinas sobre Vitronectina.**

Para la derivación de células madre embrionarias bovinas en ausencia de iMEF, se utilizaron grupos de 3-4 blastocistos de día 7-8 de desarrollo producidos por FIV. Se evaluaron tres condiciones: en la primera condición, las líneas de CMEB fueron derivadas y mantenidas sobre Vitronectina utilizando medio NBFR suplementado con 20 ng/mL de Activina A. En la segunda condición, las líneas de CMEB fueron derivadas y mantenidas sobre Vitronectina utilizando medio condicionado NBFR suplementado con 20 ng/mL de Activina A (6.5). En la tercera condición, las líneas de CMEB fueron derivadas sobre iMEF durante el pasaje cero y en el primer pasaje fueron cultivadas sobre Vitronectina utilizando medio NBFR suplementado con 20 ng/mL de Activina A. La totalidad del cultivo fue sub-cultivado cada 7-10 días. El medio de cultivo

fue cambiado diariamente y las células fueron mantenidas durante 5 pasajes a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Cada condición fue repetida tres veces.

#### **6.14: Criopreservación de las líneas de células madre embrionarias bovinas.**

Para la criopreservación de las líneas de CMEB, el medio de cultivo celular fue removido, se hizo un lavado con DPBS y las células fueron incubadas con la mitad del volumen del pocillo de Tryple Express por 3 minutos a 37 °C. Luego, se colocaron 3 volúmenes de DPBS y se centrifugó la suspensión celular por 5 minutos a 300 g. El *pellet* fue resuspendido lentamente en medio de criopreservación el cual consistía en medio NBFR o TPFR suplementado con 10 µM de Rocki y 10% de DMSO. La suspensión celular fue fraccionada en criotubos de a 500 µL los cuales fueron colocados en un contenedor que contenía isopropanol (Mr. Frosty) a -80 °C. Luego de 24 h, los criotubos fueron transferidos a un tanque con nitrógeno líquido donde fueron almacenados indefinidamente. Para descongelar las células, los criotubos fueron removidos del nitrógeno líquido y calentados en un baño térmico a 37 °C. Luego, se transfirió el contenido a un tubo cónico de 15 mL que contenía 2 mL de medio NBFR o TPFR, se centrifugó por 5 minutos a 300 g, y se resuspendió el *pellet* en medio NBFR o TPFR suplementado con 10 µM de Rocki en el volumen correspondiente a la placa de cultivo que se iba a utilizar para su cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### **6.15: Ensayo de fosfatasa alcalina.**

El ensayo de fosfatasa alcalina fue realizado utilizando el *kit Alkaline Phosphatase Staining Kit II* (Stemgent, #00-0055) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se removió el medio de cultivo, se hizo un lavado con 0,05% de Tween 20 en DPBS (DPBST) y se fijaron las células con la solución de fijación provista por el *kit* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas e incubadas con la solución “sustrato de fosfatasa alcalina” en oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con DPBST y las células fueron observadas utilizando un microscopio invertido Nikon TE2000-U. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el programa *RI Viewer Imaging*. El ensayo de fosfatasa alcalina fue realizado en todas las líneas celulares establecidas.

### 6.16: Inmunofluorescencia.

Las células madre embrionarias bovinas fueron cultivadas hasta alcanzar un 80% de confluencia. En ese momento, el medio de cultivo fue removido y las células fueron fijadas utilizando paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, se realizó la permeabilización y el bloqueo utilizando una solución de 0,3% de TritonX-100 en DPBS (TDPBS) suplementada con 3% v/v de suero normal de burro (SNB, Sigma, #D9663) durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 1 h en agitación en presencia del anticuerpo primario (Tabla XII) diluido en una solución de TDPBS suplementada con 1% v/v de SNB a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas e incubadas en presencia del anticuerpo secundario (Tabla XII) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. Además, se agregó 1 µg/mL de Hoechst 33342 para teñir el ADN. Finalmente, las células fueron observadas utilizando un microscopio invertido Nikon TE2000-U y las imágenes fueron adquiridas y procesadas utilizando el programa *NIS-Element Imaging* y *Fiji*, respectivamente. Los ensayos de inmunofluorescencia para los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2 fueron realizados en todas las líneas celulares establecidas. La expresión de GATA6 y CDX2 fue determinada en dos líneas independientes establecidas en condiciones NBFR y TPFR. La expresión de los antígenos de superficie SSEA1, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 fue estudiada en únicamente dos líneas celulares independientes establecidas en condiciones NBFR. El ensayo de inactivación del cromosoma X fue realizado en tres líneas independientes establecidas en condiciones NBFR de sexo femenino, y se utilizaron líneas de células madre embrionarias masculinas y fibroblastos provenientes de una hembra como control negativo y positivo, respectivamente.

### 6.17: Citometría de flujo.

Cuando las células madre embrionarias bovinas alcanzaron un 80% de confluencia, éstas fueron disgregadas y tratadas con el *kit BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit* (BD Bioscience, #554714) para realizar los experimentos por citometría de flujo.

Para el análisis del ciclo celular, la suspensión celular fue fijada utilizando 70% v/v de etanol frío durante 15 minutos. Luego, las células fueron incubadas con una solución de yoduro de propidio durante 15 minutos en oscuridad (BD Pharmingen, #550825).

Para la cuantificación del factor de transcripción OCT4, la suspensión celular fue fijada, permeabilizada y bloqueada utilizando la solución de permeabilización/lavado provista por el *kit* suplementada con 2% v/v de suero normal de burro por 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión celular fue incubada en presencia del anticuerpo primario anti-POU5F1 (1:500) por 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente lavada con la solución de permeabilización/lavado provista por el *kit*. Finalmente, se incubó la suspensión celular con el anticuerpo secundario IgG Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, #A-11055) por 30 minutos en oscuridad y, se realizó un lavado utilizando la solución de permeabilización/lavado provista por el *kit*. Las células inmunomarcadas fueron mantenidas en hielo hasta que se llevó a cabo su lectura. Para ambos análisis, las muestras fueron leídas por un citómetro de flujo FACScan equipado con un láser de excitación de 488 nm. Los datos fueron analizados utilizando el programa *CellQuest Pro*. Los ensayos del ciclo celular y cuantificación de OCT4 fueron realizados en dos líneas de células madre embrionarias bovinas independientes establecidas en condiciones NBRF.

### **6.18: Cariotipo.**

Cuando las células alcanzaron un 50-60% de confluencia, el medio de cultivo fue renovado y suplementado con 200 ng/mL de Demecolcina (Sigma, #D7385). La incubación con Demecolcina fue realizada durante 1 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron disgregadas y tratadas con una solución hipotónica de 0,075 M de KCl durante 10 minutos a 37 °C. Luego, las células fueron fijadas utilizando una solución en relación 3:1 de metanol y ácido acético durante 15 minutos a temperatura ambiente. El proceso de fijación fue repetido 3 veces. A continuación, la suspensión celular fue arrojada de a gotas en un portaobjetos limpio y frío. Una vez que los portaobjetos se secaron, se utilizó una solución de 5% de Giemsa (Sigma, #GS500) durante 10 minutos para teñir los cromosomas. Los portaobjetos teñidos fueron lavados, secados a temperatura ambiente y montados utilizando el medio de montaje *ClearMount mounting medium* (American MasterTech, #MMC0112). Se utilizó un microscopio invertido Nikon TE2000-U con una magnificación de 100X utilizando aceite de inmersión para lograr visualizar las metafases. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el programa *RI Viewer Imaging*. El estudio del cariotipo fue realizado para todas las líneas celulares establecidas. En todos los casos, se contabilizaron al menos 15 metafases por línea.

### 6.19: Formación de cuerpos embrionarios.

Para evaluar el potencial de diferenciación *in vitro* de las líneas de células madre embrionarias bovinas, se llevó a cabo el ensayo de formación de cuerpos embrionarios. Con este fin, las células fueron disgregadas y sembradas durante 1 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> en una placa de 35 mm en presencia del medio NBFR suplementado con 10 µM de Rocki para separar a los iMEF. Luego, el sobrenadante que contenía a las CMEB fue recolectado y se determinó la concentración celular utilizando un hemocitómetro. Se sembraron gotas de 20 µL en la tapa de una placa de 100 mm, donde cada gota contenía 1000 células (50 células/µL) y se invirtió la tapa para que las gotas quedaran en suspensión. Las gotas fueron incubadas durante 72 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> para promover la formación de los cuerpos embrionarios. Luego, cada cuerpo embrionario fue individualmente cultivado en un pocillo de placa de 96 pocillos de baja adherencia a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> en medio de diferenciación el cual estaba compuesto por medio DMEM, 20% v/v de SFB, 1% de MEM NEAA, 100 U/mL de Penicilina/Estreptomicina, 1% v/v de Glutamax, y 20 ng/mL de FGF2. Dependiendo del experimento, luego de 2 semanas de crecimiento en suspensión (3D), los agregados celulares fueron transferidos a una placa previamente tratada con gelatina y cultivados por 2 semanas más (2D). El medio de diferenciación fue renovado cada 48 h. Los ensayos de diferenciación *in vitro* fueron realizados para tres líneas independientes de células madre embrionarias bovinas establecidas en condiciones NBFR y cultivadas sobre iMEF o sobre Vitronectina.

### 6.20: Formación de teratomas.

Para validar el potencial de diferenciación *in vivo* de las líneas de células madre embrionarias bovinas, se evaluó su capacidad de formar teratomas luego de ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos. Se utilizaron 4 ratones inmunodeficientes (NOD.CB17–Prkd<sup>scid</sup>/J, The Jackson Laboratory, #001303) los cuales fueron inyectados subcutáneamente con 5x10<sup>5</sup> células embrionarias bovinas. Luego de 12 semanas, los ratones fueron sacrificados para observar la formación de teratomas. Los tumores fueron fijados utilizando paraformaldehído al 4%, embebidos en parafina, seccionados y teñidos con hematoxilina/eosina para ser estudiados histológicamente. Este ensayo fue realizado en el centro médico de la Universidad de Texas del Suroeste, Departamento de Biología Molecular bajo la aprobación del comité de cuidados animales (*Department of Molecular biology, University of Texas Southwestern Medical Center, USA*). La

capacidad teratogénica fue evaluada para dos líneas independientes de células madre embrionarias bovinas establecidas en condiciones NBFR.

### 6.21: Efecto de la suplementación o remoción de factores de crecimientos o inhibidores.

Para estudiar el rol de cada factor de crecimiento o inhibidor en la pluripotencia y proliferación celular, se cultivaron a las células madre embrionarias bovinas en los medios descritos en la Tabla X por 4 o 5 pasajes a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Este estudio fue realizado principalmente en cultivos libres de iMEF para independizarnos de los factores secretados por estas células. La concentración de los factores o inhibidores probados fueron: 2,5 µM de IWR1, 0,3 µM y 3 µM de CHIR99021 (Sigma, #SML1046), 20 ng/mL de Activina A, 20 ng/mL de FGF2 y 3 ng/mL de TGFβ1 (Proteintech, #HZ-1011).

**Tabla X:** Combinaciones probadas en la incorporación o remoción de distintos factores de crecimiento o inhibidores en el medio basal N2B27.

Condición de cultivo	iMEF	IWR1	Activina A	FGF2	TGFβ1	CHIR99021	
						0,3 µM	3 µM
+iMEF +IWR1	✓	✓	-	✓	-	-	-
+iMEF -IWR1	✓	-	-	✓	-	-	-
-iMEF + Act	-	✓	✓	✓	-	-	-
-iMEF -Act A	-	✓	-	✓	-	-	-
-iMEF +Act A + TGFβ1	-	✓	✓	✓	✓	-	-
-iMEF -Act A + TGFβ1	-	✓	-	✓	✓	-	-
-iMEF -FGF2	-	✓	✓	-	-	-	-
-iMEF -IWR1	-	-	✓	✓	-	-	-
-iMEF +IWR1 +CHIR0,3	-	✓	✓	✓	-	✓	-
-iMEF +IWR1 +CHIR3	-	✓	✓	✓	-	-	✓
-iMEF -IWR1 +CHIR0,3	-	-	✓	✓	-	✓	-
-iMEF -IWR1 +CHIR3	-	-	✓	✓	-	-	✓

### 6.22: Extracción del ARN total.

Para la extracción del ARN total se utilizó el *kit RNeasy Mini Kit* (Qiagen, #74104) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Todo el procedimiento fue realizado a temperatura



ambiente. Las células fueron incubadas en presencia de Tryple Express y centrifugadas por 5 minutos a 300 g. El *pellet* fue resuspendido en 350  $\mu$ L de la solución RLT provista por el *kit* y se agregó 1 volumen de 70% v/v de etanol. La mezcla fue transferida a una columna de afinidad de ARN y se centrifugó por 15 segundos a 8000 g. Luego, para eliminar posible ADN genómico remanente, se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa I. Para ello, se agregaron 350  $\mu$ L de la solución RW1 provista por el *kit* a la columna, se centrifugó por 15 segundos a 8000 g y se agregaron 80  $\mu$ L de la solución de DNAsa I. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se hizo un lavado con 350  $\mu$ L de la solución RW1 y se volvió a centrifugar. Una vez que teníamos el ARN libre de ADN genómico, el mismo fue lavado 2 veces agregando a la columna 500  $\mu$ L de la solución RPE provista por el *kit*. Finalmente, se agregaron 30  $\mu$ L de agua libre de ARNasa, se centrifugó por 1 minuto a 8000 g y se recuperó el eluido el cual contenía el ARN. Dependiendo del experimento, la concentración y pureza del ARN fue determinada utilizando el equipo *NanoDrop One* o *Qubit* junto con el *kit* de fluorescencia de ARN, *RNA BR Assay Kit* (Invitrogen, #Q10211).

### **6.23: Retrotranscripción del ARN.**

Para retrotranscribir el ARN, se utilizó la enzima retrotranscriptasa *SuperScript III* (SIII, Invitrogen, #18080044) y se siguieron las instrucciones brindadas por el fabricante. Brevemente, se hizo una mezcla de reacción de 13  $\mu$ L que incluía 500 ng de ARN, 100 ng de oligonucleótidos al azar (*random primers*, Invitrogen, #48190-011), 1mM de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPS que incluyen dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y agua libre de nucleasas. Se incubó la mezcla durante 5 minutos a 65 °C para desnaturalizar el ARN y luego se la colocó en hielo para evitar la re-naturalización. Se agregaron a la mezcla de reacción 0,01 M de DTT y 200 U de la SIII con su *buffer* correspondiente. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos para favorecer la unión de los oligonucleótidos al templado, luego por 50 minutos a 50 °C para que ocurra la retrotranscripción, y finalmente por 15 minutos a 70 °C con el fin de inactivar a la enzima. La concentración del ADN copia (ADNc) obtenido fue determinada utilizando el equipo *NanoDrop One*. El ADNc fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

### **6.24: Extracción del ADN genómico.**

Para los experimentos de determinación del sexo (6.25) y detección de micoplasma (6.27), se extrajo el ADN genómico (ADNg) de las células utilizando una solución de extracción de ADNg

casera. Las células fueron incubadas en presencia de Tryple Express y centrifugadas por 5 minutos a 300 g. El *pellet* fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de la solución de lisis la cual consistió en 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,001% m/v de gelatina, 0,5% v/v de NP-40, 0,5% v/v de Tween-20 y 0,1 mg/mL de proteinasa K e incubado por 60 minutos a 60 °C. Finalizada la lisis, se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se incubó la mezcla por 30 minutos a -20 °C para precipitar los ácidos nucleicos, y se centrifugó por 30 minutos a 4 °C a velocidad máxima. El *pellet* que contenía el ADNg fue lavado con 70% v/v de etanol y finalmente resuspendido en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ADNg fue determinada utilizando el equipo *NanoDrop One*. El ADNg fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

### 6.25: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación del ADNc o ADNg, se realizó una PCR a tiempo final utilizando el reactivo *Go Taq Hot Start Green Master Mix* (Promega, #M5122) y se respetaron las indicaciones del fabricante. Se realizó una mezcla de reacción de 25  $\mu\text{L}$  que poseía 200 ng del ADNc/ADNg, 1  $\mu\text{M}$  del oligonucleótido sentido, 1  $\mu\text{M}$  del oligonucleótido antisentido, agua libre de nucleasas y la mezcla de reacción provista por el *kit* la cual incluía a la polimerasa con su *buffer* de reacción, los dNTPS y el  $\text{MgCl}_2^{2+}$ . Como control negativo de la PCR, se realizó una mezcla de reacción en la cual se agregó agua en lugar de ADN. El ciclado de la PCR consistió en un ciclo de 2 minutos a 95 °C para activar la enzima y desnaturalizar el ADN, seguido 35 ciclos de: 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del templado), 30 segundos a 55 °C (unión de los oligonucleótidos al templado), 30 segundos a 72 °C (polimerización), y finalizando con un ciclo de polimerización de 5 minutos a 72 °C. Finalizada la PCR, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa 3% m/v. Los oligonucleótidos utilizados se encuentran detallados en la Tabla XIII, sección 6.34.

### 6.26: PCR en tiempo real (qPCR).

Para la qPCR, se extrajo el ARN total de las muestras (6.22) y se retrotranscribió el ARN (6.23). Una vez obtenido el ADNc, se preparó la mezcla de reacción según las instrucciones del fabricante del reactivo *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, #A2572). Las muestras fueron procesadas por el equipo *QuantStudio 3 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando los ciclos sugeridos por el fabricante. Brevemente, el ADNc fue diluido en relación 1:5 y se lo mezcló con el reactivo *PowerUp SYBR Green Master Mix* (1X), 0,3  $\mu\text{M}$  de

cada oligonucleótido sentido y antisentido (Tabla XIII, 6.34), y agua hasta obtener un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Se amplificó el control negativo de retrotranscripción en donde se reemplazó a la retrotranscriptasa por agua durante la RT-PCR; y el control negativo de amplificación en donde se reemplazó al ADNc por agua. La expresión relativa de los genes de interés fue determinada en dos líneas independientes de las células madre embrionarias bovinas, utilizándose duplicados técnicos. Como parámetro de calidad de la lectura, se estudió la curva de disociación en donde se buscó la presencia de un único amplicón (único pico). Debido a que los oligonucleótidos poseían una eficiencia de amplificación del 100%, los datos fueron analizados por el método de  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , en donde la expresión relativa de cada gen fue normalizada según la expresión relativa del gen de referencia *HMBS*.

### **6.27: Detección de *Mycoplasma sp.***

El ensayo de detección de micoplasma fue realizado una vez por mes en todas las líneas celulares utilizadas. Dependiendo del cultivo y de la disponibilidad de reactivos, se detectó la bacteria utilizando dos metodologías distintas. Ambos métodos incluyeron oligonucleótidos específicos que hibridaban con una región conservada del ARN ribosomal 16S de la bacteria y son capaces de detectar múltiples especies del género micoplasma, entre ellos *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, y *Mycoplasma pirum*.

Uno de los métodos utilizados consistió en usar el *kit LookOut<sup>®</sup> Mycoplasma PCR Detection Kit* (Sigma, #MP0035) el cual permitía la detección de micoplasma a partir del sobrenadante de cultivo. Brevemente, cuando las células se encontraban en confluencia, se colectaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cultivo y se lo calentó por 5 minutos a 95 °C. Se centrifugó por 5 segundos a máxima velocidad para precipitar el *debris* celular, y se tomaron 2  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para la reacción de PCR. Para la PCR se realizó una mezcla de 25  $\mu\text{L}$  que contenía el sobrenadante de la muestra a analizar, la mezcla de reacción provista por el *kit* y 1 U de la polimerasa *JumpStart Taq DNA Polymerase* (Sigma, # D9307). Por cada reacción de detección de micoplasma, se incluyó un control positivo y un control negativo los cuales estaban incluidos en el *kit*. Los ciclos de PCR fueron: 1 ciclo de 2 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 40 segundos a 72 °C. Finalmente se analizó el producto de PCR mediante electroforesis

en gel de agarosa 1,2% m/v. Una muestra negativa para micoplasma resultaba en un amplicón de 481 pb, mientras que una muestra positiva resultaba en amplicones de 481 pb y 259 pb.

El otro método se basó en la detección de micoplasma desde el ADNg de las muestras. El primer paso consistió en extraer el ADNg (6.24), seguido de una reacción de PCR. Se realizó una mezcla de reacción de PCR de 25  $\mu$ L que incluía el *buffer* de reacción de la ADN polimerasa, 2 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de dNTPS, 1  $\mu$ M del oligonucleótido sentido y antisentido (Tabla XIII, sección 6.34), 200 ng de ADNg, 1 U de la ADN polimerasa *PlatinumTaq DNA Polimerasa* y agua libre de nucleasas. Se incluyó un control negativo en el cual se reemplazó el ADNg por agua, y un control positivo en el cual se reemplazó el ADNg por ADN de un plásmido que poseía clonada la región 16S de la bacteria. Los ciclos de PCR fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 40 segundos a 72 °C, y un ciclo final de 5 minutos a 72 °C. El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 2% m/v. La ausencia de amplicones indicaba que una muestra era negativa para micoplasma, mientras que un amplicón de 270 pb indicaba que una muestra estaba contaminada con la bacteria.

### **6.28: Preparación de las líneas celulares para 3'-Tag-RNA-Seq y CUT&Tag.**

Para los 2 ensayos se utilizaron las mismas líneas celulares con algunas variaciones. En el caso de *CUT&Tag*, se utilizaron 3 líneas de TNCS-CMEB, 3 líneas de FIV-CMEB de sexo masculino, y la línea de fibroblastos de sexo masculino que se uso durante la maniobra de TNCS. Para la secuenciación del ARN, se utilizaron las mismas líneas que se utilizaron para *CUT&Tag*, pero además se sumaron la línea PAR-CMEB y 2 líneas de fibroblastos de las cuales 1 era de sexo femenino y 1 era de sexo masculino. Las líneas somáticas en pasaje 7 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB en 4 pocillos de placas de 6 pocillos a 37 °C, 5%  $CO_2$  hasta alcanzar un 80% de confluencia. Las líneas de células madre en pasaje 8 fueron cultivadas en 5 pocillos de placa de 6 pocillos sobre iMEF con medio NBFR a 37 °C, 5%  $CO_2$  hasta alcanzar un 80% de confluencia. Los ensayos de 3'-Tag-RNA-Seq y *CUT&Tag* fueron realizados a partir del cultivo en simultáneo de las líneas de CMEB y fibroblastos. En el caso de las células madre embrionarias bovinas, los iMEF fueron removidos previo a su utilización (6.29).

### **6.29: Remoción de los iMEF.**

Para la remoción de los iMEF se utilizó el *kit Feeder Removal Microbeads Mouse* (MACs, Miltenyi Biotec, #130-095-531) el cual utiliza bolitas magnéticas conjugadas a un anticuerpo

monoclonal que tiene afinidad por los iMEF los cuales son negativamente seleccionadas al ser sometidos a un campo magnético. Se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada línea celular cultivada en al menos 5 pocillos de placa de 6 pocillos con un 80% de confluencia, fue incubada con Tryple Express. Luego de 3 minutos a 37 °C, la reacción enzimática fue detenida utilizando NBFR suplementado con 10 µM de Rocki. Se utilizó una seropipeta de 5 mL para disociar a las células completamente. Luego la suspensión celular fue filtrada con un filtro de 30 µm (MACs, Miltenyi Biotec, #130-041-407) para eliminar grupos celulares y obtener células individuales. Se utilizó un hemocitómetro para determinar la concentración celular. Luego las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 300 g y el *pellet* fue resuspendido en 80 µL de medio y 20 µL de la solución de bolitas magnéticas conjugadas al anticuerpo. La solución de 100 µL fue incubada por 15 minutos en la heladera y finalmente se agregaron 400 µL de medio. Se procedió a realizar la separación magnética. Con este objetivo, los 500 µL de la suspensión celular fueron colocados en una columna sometida a un campo magnético y se recolectó el eluido que contenía a las células madre embrionarias bovinas. La columna fue lavada 2 veces, colocando 500 µL de medio y recolectando el eluido, con el fin de recuperar la totalidad de las CMEB. Finalmente, la concentración celular fue determinada utilizando un hemocitómetro y las células fueron criopreservadas y conservadas a -170 °C hasta el momento de su utilización en las técnicas de 3'-*Tag-RNA-Seq* y *CUT&Tag*.

### **6.30: 3'-*Tag-RNA-Seq*.**

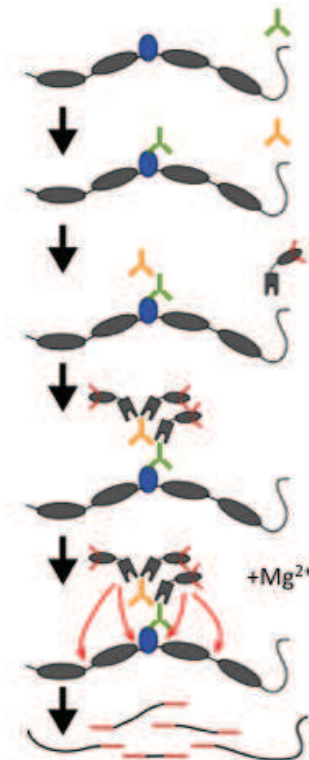
Se extrajo el ARN de 500.000 células de cada muestra como se detalla en el inciso 6.22. Una vez extraído el ARN, su concentración y pureza fue determinada utilizando el equipo *Qubit* junto con el *kit* de fluorescencia de ARN, *RNA BR Assay Kit*. Se buscó que la concentración del ARN sea de al menos 100 ng/µL con relación de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  similar a 2. Además, previo a la secuenciación, las muestras fueron analizadas en el equipo de electroforesis automática *Bio-Rad Experion™ Automated Electrophoresis System* para ver la integridad de los ARN ribosomales 18S y 28S, buscándose un *RNA quality index* (RQI) cercano a 10. Cumplidos estos parámetros, el ARN fue enviado al centro de secuenciación *DNA Technologies and Expression Analysis Core, UC Davis Genome Center, USA* para preparar las bibliotecas y realizar el ensayo de 3' *Tag-RNA-Seq*. Se utilizaron secuenciadores *Illumina HiSeq 4000* con lecturas de 90 pb de extremo único. El

análisis bioinformático fue realizado por el departamento de ciencia animal de la Universidad de California, Davis, USA (*Animal Science, UC Davis, USA*).

Para el procesamiento de los datos, se comenzó por identificar a los identificadores moleculares únicos (UMIs) mediante la opción *umi\_tools* (v1.0.0) *extract* (*options -extract-method=string -bc-pattern=NNNNN -L*). Los UMIs son etiquetas moleculares que corresponden a las 6 primeras bases de las lecturas, los cuales son adheridos al material genético previo a su amplificación para poder contar lecturas de forma única y precisa, evitando que los amplicones de la misma lectura sean contados más de una vez (duplicados de PCR). Las lecturas fueron alineadas con el genoma bovino ensamblado de referencia *ARS-UCD1.2* utilizando el programa *STAR* utilizando las opciones *-outFilterMultimapNmax 20 -alignSJoverhangMin 8 -alignSJDBoverhangMin 1 -outFilterMismatchNmax 999 -outFilterMismatchNoverReadLmax 0.04 -alignIntronMin 20 -alignIntronMax 1000000 -alignMatesGapMax 1000000 -outSAMunmapped None -outFilterType BySJout -outFilterScoreMinOverLread 0.3 -outFilterMatchNminOverLread 0.3 -seedSearchStartLmax 30*. Los duplicados y los alineamientos de baja calidad ( $q < 5$ ) fueron eliminados utilizando las herramientas *umi\_tools* (v1.0.0) *dedup* y *SAMtools* (v1.9), respectivamente. Utilizando la herramienta *deepTools* (v3.2.0), las lecturas fueron normalizadas en CPM usando ventanas de a 50 pb que abarcaban todo el genoma. Los alineamientos fueron asignados a genes utilizando el programa *HTSeq-count* (v0.10.0) (opción: *-mode=intersection-nonempty -stranded=yes*) considerando a aquellos alineamientos que se solapaban con exones y con regiones 3' UTRs. Debido a que la técnica de *3'-Tag-RNA-Seq* requiere un genoma de referencia que posea extremos 3' UTR correctamente anotados, los extremos 3' UTR bovinos fueron extendidos a 1000 pb únicamente si esas regiones carecían de una anotación previa. Para el análisis de la expresión génica, se consideraron únicamente genes codificantes. Las lecturas crudas fueron normalizadas en CPM y los genes fueron considerados expresados si las CPM acumulativas en todas las muestras eran mayores a 20. Los genes diferencialmente expresados fueron determinados utilizando el programa *DESeq2* (v1.26.0), considerando un valor  $p < 0,01$  y un índice de cambio  $> 2$ . El análisis del enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados fue realizado con parámetros de rigurosidad media con el programa *Gene ontology*, utilizando las sub-bases de datos *GOTERM\_BP\_DIRECT* y *GOTERM\_MF\_DIRECT*. Los genes homólogos a los genes humanos fueron obtenidos usando el programa *BiomaRt* (v2.42.1) y usados como base de entrada para el programa *DAVID* (v6.8).

### 6.31: *Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag)*.

El ensayo de *CUT&Tag* fue realizado como detalla el laboratorio de Steven Henikoff, USA <sup>274</sup>. Esta técnica permite la detección *in situ* de modificadores de la cromatina de forma eficiente y específica, mediante el uso de un anticuerpo que posee fusionada la transposasa proteína A-Tn5 que cuando se activa, fragmenta el ADN aledaño al sitio de detección y coloca adaptadores, generando una biblioteca para su posterior secuenciación (Figura 45).



**Figura 45: Perfilado de la cromatina mediante la técnica de *Cut&Tag*.** Esquema representativo de la técnica de *CUT&Tag*. Durante esta técnica, se utiliza un anticuerpo primario (en verde) el cual reconoce específicamente a una proteína que interactúa con el ADN (en azul) entre los nucleosomas (óvalos grises). Luego, se utiliza un anticuerpo secundario (en naranja) que reconoce al anticuerpo primario y favorecerá la unión entre los anticuerpos y la proteína A-transposasa Tn5 (cuadrados grises) que a la vez, posee pre-cargados adaptadores de secuenciación (líneas rojas). El complejo proteína A-Tn5 será posteriormente activado mediante el agregado de magnesio, y comenzará a realizar cortes en la cromatina en los sitios adyacentes a donde ocurrió el reconocimiento. A medida que se realizan los cortes en el ADN, los adaptadores de secuenciación quedarán unidos a cada fragmento del ADN digerido. Los fragmentos de ADN etiquetados serán purificados, amplificados por PCR y finalmente secuenciados. Figura adaptada de Kaya-Okur y col., 2019 <sup>272</sup>.

En este trabajo, estudiamos el perfil de las marcas de histonas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3, utilizando 100.000 células como material de partida. Todas las muestras fueron procesadas en simultáneo. Se generaron en total 24 bibliotecas (Tabla XI).

**Tabla XI: Bibliotecas generadas para el ensayo de CUT&Tag.** Se pueden observar las 24 bibliotecas generadas para 3 líneas de CMEB derivadas a partir de embriones producidos por FIV, 3 líneas de CMEB derivadas a partir de embriones producidos por TNCS y los fibroblastos utilizados como donantes nucleares durante la técnica de TNCS. El control negativo fue realizado para 1 línea de cada fuente celular y se utilizó IgG en lugar de un anticuerpo específico.

Biblioteca	Muestras	Marcas de histonas
1	FIV-CMEB 1	H3K4me3
2	FIV-CMEB 2	H3K4me3
3	FIV-CMEB 3	H3K4me3
4	TNCS-CMEB 1	H3K4me3
5	TNCS-CMEB 2	H3K4me3
6	TNCS-CMEB 3	H3K4me3
7	Fibroblastos	H3K4me3
8	FIV-CMEB 1	H3K27me3
9	FIV-CMEB 2	H3K27me3
10	FIV-CMEB 3	H3K27me3
11	TNCS-CMEB 1	H3K27me3
12	TNCS-CMEB 2	H3K27me3
13	TNCS-CMEB 3	H3K27me3
14	Fibroblastos	H3K27me3
15	FIV-CMEB 1	H3K9me3
16	FIV-CMEB 2	H3K9me3
17	FIV-CMEB 3	H3K9me3
18	TNCS-CMEB 1	H3K9me3
19	TNCS-CMEB 2	H3K9me3
20	TNCS-CMEB 3	H3K9me3
21	Fibroblastos	H3K9me3
22	Control - FIV-CMEB 3	IgG
23	Control - TNCS-CMEB 1	IgG
24	Control - Fibroblastos	IgG

Comenzamos por acondicionar las bolitas magnéticas cubiertas con concavalina A. Se utilizaron 10 µL de la solución de bolitas magnéticas cada 100.000 células. La solución de bolitas magnéticas



fue mezclada en relación 1:10 con la solución de anclaje [20 mM de HEPES pH 7,5, 10 mM de KCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MnCl<sub>2</sub> y agua milli-Q] y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se colocó el tubo en un magneto hasta que el medio se observara limpio para luego remover el medio y repetir el proceso de acondicionamiento. La solución de bolitas magnéticas acondicionadas fue resuspendida en 10 µL de solución de anclaje y se procedió a preparar las células.

Las células fueron descongeladas como se detalla en el inciso (6.14). Luego, se determinó la cantidad de células utilizando un hemocitómetro y se tomaron 100.000 células por muestra. Las 100.000 células fueron centrifugadas durante 3 minutos a 600 g y resuspendidas en 1 mL de la Solución de Lavado [SL: 20 mM de HEPES pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,5 mM de espermidina, agua milli-Q, y 1 tableta del inhibidor de proteasas libre de EDTA (para 50 mL de volumen final)]. Este proceso de lavado fue realizado dos veces. Luego del segundo lavado, las células fueron resuspendidas en 100 µL de la SL.

Una vez preparadas las células, éstas fueron incubadas con 10 µL de las bolitas magnéticas acondicionadas previamente durante 10 minutos a temperatura ambiente en un rotador de 360° para promover la unión de las bolitas a las células. Finalizada la incubación, el tubo fue colocado en un magneto hasta que el medio se observara limpio. Se descartó el medio, se removió el tubo del magneto y se resuspendió el agregado celular en 50 µL de la solución de anticuerpo fría [2 mM de EDTA, 0,1% de BSA y Solución de Lavado y Digitonina (SLD) la cual consistía en 0,05% de digitonina y SL].

A continuación, se incubaron las células con el anticuerpo primario. Se agregó 1 µL de cada anticuerpo primario a cada muestra [1:50, conejo anti-H3K27me3 (Diagenode, #C15410195), conejo anti-H3K9me3 (Diagenode, # C15410193), conejo anti-H3K4me3 (Diagenode, #C15410003), y conejo IgG (Diagenode, #C15410206)] y se incubó durante toda la noche a 4 °C en un agitador suave.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario. Con este objetivo, las células fueron colocadas en un magneto hasta que el medio se observara limpio, se removió el medio, y se agregaron 100 µL de la SLD. Se agregó 1 µL del anticuerpo secundario [1:100, cerdo anti-IgG de conejo (AntibodiesOnline, #ABIN101961)] y se incubó durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron colocadas en un magneto hasta que el medio se observara

limpio y se colocó 1 mL de la SLD para lavar las células. Este procedimiento de lavado fue repetido 3 veces y al finalizar el tercer lavado, el medio fue removido.

A continuación, se promovió la unión de la proteína A-Tn5-adaptadores con las células. Para ello, se inició por realizar una mezcla de relación 1:250 de la proteína A-Tn5-adaptadores con la Solución de Digitonina [SD: 20 mM de HEPES pH 7,5, 0,3 M de NaCl, 0,5 mM de espermidina, 0,01% de digitonina, agua milli-Q, y 1 tableta del inhibidor de proteasas libre de EDTA (para 50 mL de volumen final)]. Luego, se colocaron 100  $\mu$ L de esta solución a las células y se incubó durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó 1 mL de la SD y las células fueron colocadas en un magneto hasta que el medio se observara limpio. Este proceso de lavado fue repetido dos veces y al finalizar el segundo lavado, el medio fue removido.

Una vez unida la proteína A-Tn5-adaptadores con las células, se realizó la tagmentación. Se agregaron 300  $\mu$ L de la Solución de Tagmentación [ST: 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y SD] y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Seguidamente, se detuvo la reacción mediante la adición de 10  $\mu$ L de 0,5 M de EDTA, 3  $\mu$ L de 10% de SDS y 2,5  $\mu$ L de 20 mg/mL de Proteinasa K.

Luego de la tagmentación, se procedió por extraer los fragmentos de ADN solubilizados. Para ello, la mezcla fue agitada a máxima velocidad e incubada durante 1 hora a 50 °C. Luego, se agregaron 300  $\mu$ L de fenol-cloroformo-isoamílico, se agitó a máxima velocidad y se transfirió la mezcla a un tubo de separación de fases (Qiagen). Se centrifugó durante 3 minutos a 16000 g a temperatura ambiente, luego se adicionaron 300  $\mu$ L de cloroformo, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar por 3 minutos a 16000 g. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se la colocó en un tubo *Eppendorf* que contenía 750  $\mu$ L de etanol puro frío. Luego de 10 minutos en hielo, se centrifugó por 15 minutos a 16000 g a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 1 mL de etanol puro y se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 16000 g a 4 °C. Finalmente, se removió cuidadosamente el sobrenadante, y luego de 5 minutos a temperatura ambiente, el *pellet* fue resuspendido en 25  $\mu$ L de 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA y 1:400 de ARNasa A e incubado por 10 minutos a 37 °C para que se degrade el posible ARN remanente.

Una vez obtenido el ADN, éste fue amplificado y etiquetado por PCR. En un tubo de 0,2 mL, se mezclaron 21  $\mu$ L del ADN con 2  $\mu$ L del oligonucleótido universal i5 (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ L de los oligonucleótidos con etiqueta i7 (10  $\mu$ M) y 25  $\mu$ L de la mezcla de PCR *NEBNext HiFi 2x PCR Master mix*. Para cada muestra se utilizó una etiqueta distinta (Tabla XIV, sección 6.35). Los ciclos

de la PCR fueron: 1 ciclo a 72 °C por 5 min para obtener extremos romos, 1 ciclo a 98 °C por 30 segundos para la desnaturalización del templado, 14 ciclos de 98 °C por 10 segundos y 63 °C por 10 segundos para desnaturalizar el ADN, promover la unión de los oligonucleótidos y polimerización del templado, y un ciclo a 72°C por 1 min para la polimerización final.

Finalizada la amplificación del ADN, se purificó el producto de PCR colocando 1,1 volúmenes (55 µL) de las bolitas magnéticas *Ampure XP beads*, se mezcló y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para promover la unión de las bolitas al ADN. Seguidamente, se colocó el tubo en un magneto hasta que el medio se observara limpio. Se removió el medio y, sin remover el tubo del magneto, se colocaron 200 µL de 80% v/v de etanol. Este lavado fue realizado por duplicado. Luego, se agregaron 25 µL del *buffer EB* (Qiagen), se agitó a máxima velocidad, se colocó el tubo en el magneto hasta que el medio se observada limpio, y se transfirió este medio (el cual contenía el ADN purificado) a un tubo *Eppendorf*.

La concentración del ADN fue determinada utilizando el equipo *Qubit* junto con el *kit* de fluorescencia de ADN, *dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (ThermoFisher, #Q32854). Como control previo a la secuenciación, las muestras fueron cargadas en un *Lab-On-Chip* y leídas en un sistema de electroforesis automática *Agilent 2100 Expert Bioanalyzer* para verificar la pureza de las muestras, los tamaños de los fragmentos y la concentración. Finalmente, las muestras fueron agrupadas de forma tal que cada biblioteca contribuya con una concentración similar y se obtengan al menos 1,5 femtomoles totales. Las muestras agrupadas fueron enviadas al *DNA Technologies and Expression Analysis Core, UC Davis Genome Center, USA* donde removieron fragmentos mayores a 1000 pb y oligonucleótidos remanentes de la PCR. Se realizó una secuenciación *Illumina HiSeq 4000* de extremos pareados terminales. El análisis bioinformático fue realizado por el departamento de ciencia animal de la Universidad de California, Davis, USA (*Animal Science, UC Davis, USA*).

Las lecturas crudas obtenidas fueron procesadas utilizando el programa *trim\_galore* (v0.4.0) con las opciones *-q 20 -stringency 1 -paired -length 10* para eliminar los adaptadores de la secuenciación y las secuencias de baja calidad. Las lecturas procesadas de cada muestra fueron alineadas con el genoma bovino ensamblado de referencia *ARS-UCD1.2* utilizando el programa *BWA* (v0.7.17-r1188). Una vez alineadas, se eliminaron los duplicados de PCR y las secuencias que presentaban un alineamiento de baja calidad ( $q < 3$ ) utilizando *PicardTools* (v2.8.1) y *SAMtools* (v1.7), respectivamente. Utilizando la herramienta *deepTools* (v3.2.0), las lecturas fueron

normalizadas en CPM usando ventanas de a 50 pb que abarcaban todo el genoma. A continuación, la señal normalizada de las distintas bibliotecas fue escalada en ventanas de a 500 pb con la función *deepTools multiBigwigSummary* para una mejor visualización de los datos. La función *deepTools plotPCA* fue utilizada para comparar la señal normalizada en todas las bibliotecas para todas las marcas analizadas en los 100.000 *locis* con mayor variación (opciones: *-transpose -log2 -ntop 100,000*). La función *deepTools plotCorrelation* fue usada para calcular la correlación de *Pearson* entre las distintas bibliotecas. Posteriormente, para ver la distribución de las marcas de histonas en el genoma se utilizó la herramienta de *Package epic2 (v0.0.41)* para identificar los picos de llamada máxima (del inglés “*peaks calling*”), es decir, cada región del genoma modificada por cada marca de histona. Este análisis fue realizado para cada una de las 24 bibliotecas generadas, para cada tipo celular (FIV-CMEB, TNCS-CMEB o fibroblastos) y para cada modificación de histona (H3K4m3, H3K27me3, H3K9me3). Para ello, el genoma fue escaneado cada 200 pb, buscándose regiones enriquecidas por alguna de las modificaciones de histonas estudiadas, y con un índice de falsos positivos menor al 0,05 (FDR < 0,05). A continuación, los picos resultantes de cada uno de los análisis fueron combinados, y de ese grupo de picos combinados, se cuantificó la señal de los picos para cada biblioteca. Para ello, utilizando la función *BEDtools (v2.26.0)* se cuantificaron los alineamientos que poseían picos que se superponían con al menos el 50% de la longitud del alineamiento. Luego, la señal de cada región genómica (recuentos de alineamientos en cada pico) fue normalizada en RPKM para efectuar el análisis de componentes principales e identificar regiones con diferente señal de las marcas de histonas estudiadas (valor  $p < 0,01$ ) utilizando el programa DESeq2 (v1.26.0).

Finalmente, la categorización de la cromatina fue realizada por el programa ChromHMM (v1.20) utilizando un modelo de ocho estados: heterocromatina (H3K9me3), quiescente (ausencia de marcas), heterocromatina (H3K9me3 y H3K27me3), regiones represoras *polycomb* (H3K27me3), regiones repetitivas/CNV/Artefactos (H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3), promotores bivalentes/*enhancers* (H3K4me3 y H3K27me3), promotores activos (H3K4me3), genes zinc/heterocromatina bivalente (H3K4me3 y H3K9me3). Además, utilizando este mismo programa se calculó el enriquecimiento de los estados de la cromatina en las regiones genómicas que abarcaban genes anotados (Ensembl v99), regiones repetitivas (RepeatMasker- UCSC) e islas CpG (NCBI). Otro de los análisis consistió en categorizar a los genes según el estado de la cromatina en sus promotores. Para ello, se determinó el estado de la cromatina en regiones de 1 kb río arriba y río

abajo del sitio de comienzo de la transcripción y se le asignó aquel estado que este presente en al menos el 50% de la longitud del promotor. Para futuros análisis, únicamente se consideraron aquellos genes que conservaran el mismo estado de la cromatina en su promotor en las 3 réplicas analizadas para cada fuente celular. Los grupos de genes encontrados y los genes homólogos a los genes humanos fueron determinados usando el programa *BioMaRt* (v2.42.1) y usados como base de entrada para el programa *DAVID* (v6.8). El análisis del enriquecimiento funcional de los grupos de genes identificados fue realizado con parámetros de rigurosidad media con el programa *Gene ontology*, utilizando las sub-bases de datos *GOTERM\_BP\_DIRECT* y *GOTERM\_MF\_DIRECT*.

### 6.32: Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados con el programa *GraphPad Prism 6* (2013), utilizando el ensayo de ANOVA con el método de Tukey para combinaciones múltiples. Se expresó la media  $\pm$  el error estándar, considerándose diferencias estadísticamente significativas aquellas muestras que mostraban un valor  $p < 0,05$ .

### 6.33: Anticuerpos utilizados durante los ensayos de inmunofluorescencia.

**Tabla XII:** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpos	Nombre y dilución	Marca y Catálogo
Anticuerpo primario	SOX2 (1:300)	BioGenex, AN579-5M
Anticuerpo primario	POU5F1 (1:300)	Santa Cruz Biotechnology, sc-8628
Anticuerpo primario	GATA6 (1:300)	Santa Cruz Biotechnology, sc-9055
Anticuerpo primario	CDX2 (1:300)	Biogenex, MU392A-UC
Anticuerpo primario	SSEA1 (5 $\mu$ g/mL)	Developmental Studies Hybridoma Bank, MC-480
Anticuerpo primario	SSEA4 (5 $\mu$ g/mL)	Developmental Studies Hybridoma Bank, MC813-70
Anticuerpo primario	TRA-1-60 (1:250)	Santa Cruz Biotechnology, sc-21705
Anticuerpo primario	TRA-1-81 (1:250)	Santa Cruz Biotechnology, sc-21706
Anticuerpo primario	H3K27me3 (1:1000)	Millipore, #ABE44
Anticuerpo secundario	IgG Alexa Fluor 488 (1:500)	Invitrogen, A-21206
Anticuerpo secundario	IgG Alexa Fluor 568 (1:500)	Invitrogen, A-11057
Anticuerpo secundario	IgG Alexa Fluor 568 (1:500)	Invitrogen, A-21043
Anticuerpo secundario	IgG Cy3 (1:500)	Jackson ImmunoResearch, 715-165-151

### 6.34: Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de PCR y qPCR.

**Tabla XIII:** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR y qPCR.

Gen blanco	Oligonucleótido Sentido (5'→3')	Oligonucleótido Antisentido (5'→3')
OCT4	AACGAGAATCTGCAGGAGATATG	TCTCACTCGGTTCTCGATACT
NANOG	CAGCTACAAGCAGGTGAAGA	CTATTCCTCGGCCAGTTGTT
SOX2	CATTAACGGCACACTGCCCC	TGAAAATGTCTCCCCGCCC
SOX17	AAGATGCTGGGCAAGTCG	CGGTACTTGTAGTTGGGATGG
CDX2	TGGGCAGCCAAGTGAAA	CTTTCCTCCGGATGGTGATATAG
MEOX1	GGAGAATTCAGACAACCAGGAG	TGAGCAAACCTCAGCTTCGAG
FOXA2	CCCTTCTCCATCAACAACCT	GTAGGCCTTGAGGTCCATTT
PAX6	CCCTGGAGAAAGAGTTTGAGAG	TCCATTTGGCCCTTCGATTAG
HMBS	CTCACCATTGGAGCTGTCT	TAGTTCCTACCACACTCTTCTCT
DDX3X/DDX3Y	AGGAAGCCAGGAAAGTAA	CATCCACGTTCTAAGTCTC
MICOPLASMA	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC

### 6.35: Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de *CUT&Tag*.

**Tabla XIV:** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de *CUT&Tag*.

Oligonucleótido	Etiqueta	Secuencia 5'→3'
i5 universal	-	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTG
i7 etiqueta A	CGTACTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta B	AGGCAGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta C	TCCTGAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta D	GGACTCCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGAGTCCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta E	TAGGCATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATGCCTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta F	CTCTCTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGAGAGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta G	CAGAGAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTCTCTGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta H	GCTACGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCGTAGCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta I	CGAGGCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGCCTCGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta J	AAGAGGCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCCCTTTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

Materiales y métodos

i7 etiqueta K	GTAGAGGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TCTCTAC</b> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta L	GTCGTGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ATCACGAC</b> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta M	ACCACTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACAGTGGT</b> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta N	TGGATCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CAGATCC</b> AGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta O	CCGTTTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACAAACGGG</b> TCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta P	TGCTGGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACCCAGC</b> AGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta Q	GAGGGGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AACCCCT</b> CGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta R	AGGTTGGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CCCAACCT</b> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta S	GTGTGGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CACCACAC</b> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta T	TGGGTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GAACCC</b> AGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta U	TGGTCACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TGTGACC</b> AGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta V	TTGACCCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGGGTCA</b> AGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta W	CCACTCCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGGAGTGGG</b> TCTCGTGGGCTCGGAGATGT
i7 etiqueta X	TAAGGCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TCGCCTT</b> AGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

## ○ Referencias



1. Cockburn, K. & Rossant, J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* **120**, (2010).
2. NL, V., WX, C. & HD, L. The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development* **146**, (2019).
3. Sasaki, H. Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Dev. Growth Differ.* **52**, 263–273 (2010).
4. J, A. & C, C. A close look at the mammalian blastocyst: epiblast and primitive endoderm formation. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3327–3338 (2014).
5. Gilbert SF. *Developmental Biology, 9th edition.* (Sinauer Associates, 2010).
6. L, W. *et al.* Recent advances in mammalian reproductive biology. *Sci. China. Life Sci.* **63**, 18–58 (2020).
7. Carillo, D., Lenis, Y. & Rodriguez-Osorio, N. Conceptos básicos de desarrollo embrionario en la vaca. in 69–96 (2014).
8. White, M. D. *et al.* Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. *Cell* **165**, 75–87 (2016).
9. Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L. & Daley, G. Q. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res.* **20**, 982–993 (2010).
10. N, K. *et al.* Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* **63**, 1698–1705 (2000).
11. Daigneault, B. W., Rajput, S., Smith, G. W. & Ross, P. J. Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. doi:10.1038/s41598-018-25964-x
12. Ozawa, M. *et al.* Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Dev. Biol.* **12**, 1 (2012).
13. Wu, G. & Schöler, H. R. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration* **3**, 3:7 (2014).
14. Lanza, R. & Atala, A. *Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition. Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition* (Elsevier Inc., 2013). doi:10.1016/C2012-0-06957-8
15. Frum, T. *et al.* Oct4 Cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst. *Dev. Cell* **25**, 610–622 (2013).
16. Nichols, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379–391 (1998).

17. Mitalipov, S. *et al.* Isolation and Characterization of Novel Rhesus Monkey Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells* **24**, 2177–2186 (2006).
18. Pal, R., Mandal, A., Rao, H. S., Rao, M. S. & Khanna, A. A panel of tests to standardize the characterization of human embryonic stem cells. *Regenerative Medicine* **2**, 179–192 (2007).
19. Hay, D. C., Sutherland, L., Clark, J. & Burdon, T. Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **22**, 225–235 (2004).
20. Velkey, J. M. & O’Shea, K. S. Oct4 RNA interference induces trophectoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *Genesis* **37**, 18–24 (2003).
21. Niwa, H., Miyazaki, J. I. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* **24**, 372–376 (2000).
22. Keramari, M. *et al.* Sox2 Is Essential for Formation of Trophectoderm in the Preimplantation Embryo. doi:10.1371/journal.pone.0013952
23. MD, G. & JB, C. Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* **90**, (2014).
24. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126–140 (2003).
25. Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S. ya, Nakatsuji, N. & Kawase, E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells* **15**, 455–470 (2010).
26. Masui, S. *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 625–635 (2007).
27. Pfeffer, P. L. Building Principles for Constructing a Mammalian Blastocyst Embryo. *Biology (Basel).* **7**, 41 (2018).
28. A, G. *et al.* Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4139–4144 (2014).
29. Chambers, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655 (2003).
30. Ortega, M. S. *et al.* NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. doi:10.1002/mrd.23304

31. Hyslop, L. *et al.* Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages. *Stem Cells* **23**, 1035–1043 (2005).
32. Mitsui, K. *et al.* The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642 (2003).
33. Simmet, K. *et al.* OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. doi:10.1073/pnas.1718833115
34. Kalkan, T. & Smith, A. Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, (2014).
35. Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C. & Orkin, S. H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 12355–12358 (1996).
36. Tsai, F.-Y. *et al.* An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nat.* 1994 3716494 **371**, 221–226 (1994).
37. Molkenin, J. D., Tymitz, K. M., Richardson, J. A. & Olson, E. N. Abnormalities of the Genitourinary Tract in Female Mice Lacking GATA5. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5256–5260 (2000).
38. Pandolfi, P. P. *et al.* Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* 1995 111 **11**, 40–44 (1995).
39. Morrisey, E. E. *et al.* GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**, 3579–3590 (1998).
40. Kuijk, E. W. *et al.* Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev. Dyn.* **237**, 918–927 (2008).
41. C, C., Y, Y., T, P. & J, R. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* **10**, 615–624 (2006).
42. Fujikura, J. *et al.* Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* **16**, 784–789 (2002).
43. Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R. & Grosveld, F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* **126**, 723–732 (1999).

44. Tiyaboonchai, A. *et al.* GATA6 Plays an Important Role in the Induction of Human Definitive Endoderm, Development of the Pancreas, and Functionality of Pancreatic b Cells. *Stem cell reports* (2017). doi:10.1016/j.stemcr.2016.12.026
45. D, S. *et al.* Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093–2102 (2005).
46. Niwa, H. *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell* **123**, 917–929 (2005).
47. J, R. & PP, T. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* **136**, 701–713 (2009).
48. M, Z.-G., SA, M. & AW, B. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 467–477 (2009).
49. Strumpf, D. *et al.* Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093–2102 (2005).
50. H, N. *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell* **123**, 917–929 (2005).
51. Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A. & Rossant, J. Promotion to trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* (80-. ). **282**, 2072–2075 (1998).
52. LQ, Z. & J, D. Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends Cell Biol.* **25**, 82–91 (2015).
53. Pablo J. Ross, R. V. S., Sampaio, R. V., Ross, P. J. & Sampaio, R. V. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are not big mice. *Anim. Reprod.* **15**, 204–214 (2018).
54. DM, M. Should I stay or should I go: protection and maintenance of DNA methylation at imprinted genes. *Epigenetics* **7**, 969–975 (2012).
55. IA, Q. & MF, M. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 528–541 (2012).
56. L, S. & J, W. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**, (2009).
57. Gkoutela, S. & Clark, A. T. A big surprise in the little zygote: the curious business of losing methylated cytosines. *Cell Stem Cell* **15**, 393 (2014).
58. W, M., A, N., J, W., R, F. & T, H. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501–502 (2000).

59. S, G., T, F. & M, W. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* **22**, 633–641 (2012).
60. O'Neill, C. The epigenetics of embryo development. *Anim. Front.* **5**, 42–49 (2015).
61. RD, K. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868–871 (1974).
62. K, L. & TJ, R. The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 140–146 (1998).
63. A, F. *et al.* Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 332–338 (2013).
64. Hayashi, K., Yoshida, K. & Matsui, Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nat. 2005 4387066* **438**, 374–378 (2005).
65. RE, B. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.* **28**, 10–12 (2001).
66. CV, A.-V. *et al.* MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *PLoS Biol.* **8**, 53–54 (2010).
67. J, H. *et al.* Impairment of preimplantation porcine embryo development by histone demethylase KDM5B knockdown through disturbance of bivalent H3K4me3-H3K27me3 modifications. *Biol. Reprod.* **92**, (2015).
68. JA, D. *et al.* Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature* **537**, 548–552 (2016).
69. B, Z. *et al.* Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature* **537**, 553–557 (2016).
70. PJ, R. *et al.* Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction* **136**, 777–785 (2008).
71. Bogliotti, Y. S. & Ross, P. J. Mechanisms of histone H3 lysine 27 trimethylation remodeling during early mammalian development. *Epigenetics* **7**, 976 (2012).
72. N, C. *et al.* Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos. *Epigenetics* **12**, 1048–1056 (2017).
73. JS, B., D, N. & KS, Z. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends Genet.* **32**, 29–41 (2016).
74. C, W. *et al.* Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat. Cell Biol.* **20**, 620–631 (2018).

75. Liu, X. *et al.* H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. *Dev.* **145**, (2018).
76. AH, P. *et al.* Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323–337 (2001).
77. JE, D., YK, K., H, B., H, L. & E, L. Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2478–2486 (2004).
78. J, W. *et al.* The histone demethylase JMJD2C is stage-specifically expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic development. *Biol. Reprod.* **82**, 105–111 (2010).
79. MC, G. *et al.* Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1 is required for development of the bovine blastocyst. *Theriogenology* **84**, 1411–1422 (2015).
80. Canovas, S., Ross, P. J., Kelsey, G. & Coy, P. DNA Methylation in Embryo Development: Epigenetic Impact of ART (Assisted Reproductive Technologies). *Bioessays* **39**, (2017).
81. Thibier, M. Nem technologies en cattle reproduction. *Proc. 7 th FAVA Congr. Pattaya Thailand.* 512–524 (1990).
82. Gustavo A Palma. *Biotecnología de la Reproducción.* (2001).
83. MJ, C. Control of oestrous cycles of heifers with a synthetic prostaglandin analogue. *Vet. Rec.* **95**, 200–203 (1974).
84. PC, L. & DT, A. Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Annu. Rev. Physiol.* **42**, 71–82 (1980).
85. Sreenan, J. In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agric. Sci.* **75**, 393–396 (1970).
86. KP, X., T, G., H, C. & P, H. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **81**, 501–504 (1987).
87. Hatirnaz, Ş. *et al.* Oocyte in vitro maturation: A sytematic review. *Turkish J. Obstet. Gynecol.* **15**, 112 (2018).
88. C, W., D, H. & H, N. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* **68 Suppl 1**, (2007).
89. P, L., D, R., F, W. & MP, B. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* **41**, 427–437 (2001).
90. JJ, P. *et al.* Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* **25**, 591–

- 600 (1986).
91. Lonergan, P., Fair, T., Forde, N. & Rizos, D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology* **86**, 270–277 (2016).
  92. LB, F. *et al.* Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* **14**, 991–1004 (2020).
  93. Wrenzycki, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? *Anim. Reprod.*, v **13**, 279–282 (2016).
  94. H, S. Die entwicklung seitlicher und dorso-ventraler Keimhälften beim verzögerter keimversorgung. *Zeitschr Zoo* 105–134 (1928).
  95. Gurdon, J. B. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development* **10**, (1962).
  96. Campbell, K. H. S., Loi, P., Otaegui, P. J. & Wilmut, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* **1**, 40–46 (1996).
  97. Ross, P. J. & Cibelli, J. B. Bovine somatic cell nuclear transfer. *Methods Mol. Biol.* **636**, 155–177 (2010).
  98. VL, N., M, L., A, M. & KT, J. Ca(2+) oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Curr. Biol.* **12**, 746–750 (2002).
  99. RS, P., B, K., L, L. & KW, P. Changes in the structure of nuclei after transfer to oocytes. *Cloning* **2**, 117–122 (2000).
  100. Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J. B., Eilertsen, K. & Memili, E. Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology* **78**, 1869–1886 (2012).
  101. Kues, W. A. & Niemann, H. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.* **22**, 286–294 (2004).
  102. Ogura, A., Inoue, K. & Wakayama, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, (2013).
  103. Loi, P., Iuso, D., Czernik, M. & Ogura, A. A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer? *Trends Biotechnol.* **34**, 791–797 (2016).
  104. Matoba, S. & Zhang, Y. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. *Cell Stem Cell* **23**, 471–485 (2018).
  105. Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in*

- Oncology/Hematology* **51**, 1–28 (2004).
106. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells.pdf. *Nature* (1981). doi:10.1038/292154a0
  107. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1981). doi:10.1073/pnas.78.12.7634
  108. Austin, C. P. *et al.* The Knockout Mouse Project. *Nature Genetics* (2004). doi:10.1038/ng0904-921
  109. Thomson, J. A. *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1995). doi:10.1073/pnas.92.17.7844
  110. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-. ). **282**, 1145–1147 (1998).
  111. Buehr, M. *et al.* Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts. *Cell* **135**, 1287–1298 (2008).
  112. Li, P. *et al.* Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts. *Cell* **135**, 1299–1310 (2008).
  113. Navarro, M., Soto, D. A., Pinzon, C. A., Wu, J. & Ross, P. J. Livestock pluripotency is finally captured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **32**, 11–39 (2019).
  114. Zhang, B., Krawetz, R. & Rancourt, D. E. Would the real human embryonic stem cell please stand up? *Bioessays* **35**, 632–8 (2013).
  115. Brons, I. G. M. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* (2007). doi:10.1038/nature05950
  116. Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196–9 (2007).
  117. Hanna, J. H., Saha, K. & Jaenisch, R. Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.10.008
  118. Guo, G. *et al.* Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. *Dev. Cell* **18**, 675–685 (2010).
  119. Ohnishi, Y. *et al.* Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat. Cell Biol.* **16**, 27–37 (2014).
  120. Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–



- 523 (2008).
121. Ying, Q.-L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature06968
  122. Rossant, J. Stem cells and early lineage development. *Cell* **132**, 527–31 (2008).
  123. Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487–92 (2009).
  124. Silva, J. & Smith, A. Capturing Pluripotency. *Cell* (2008). doi:10.1016/j.cell.2008.02.006
  125. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* (1984). doi:10.1038/309255a0
  126. Tachibana, M. *et al.* Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell* (2012). doi:10.1016/j.cell.2011.12.007
  127. Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A. & Wilson, V. In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Rep.* **2**, 1571–8 (2012).
  128. Theunissen, T. W. *et al.* Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions. *Curr. Biol.* **21**, 65–71 (2011).
  129. Hall, J. *et al.* Oct4 and LIF/Stat3 Additively Induce Krüppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 597–609 (2009).
  130. Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**, 1063–1069 (2009).
  131. Chan, K. K. K. *et al.* KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **27**, 2114–2125 (2009).
  132. Lengner, C. J. *et al.* Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* **141**, 872–883 (2010).
  133. Payer, B., Lee, J. T. & Namekawa, S. H. X-inactivation and X-reactivation: Epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Hum. Genet.* **130**, 265–280 (2011).
  134. Bao, S. *et al.* Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **461**, 1292–1295 (2009).
  135. Hanna, J. *et al.* Metastable Pluripotent States in NOD-Mouse-Derived ESCs. *Cell Stem Cell* **4**, 513–524 (2009).
  136. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. Suppression of SHP-2 and

- ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **210**, 30–43 (1999).
137. Nichols, J., Silva, J., Roode, M. & Smith, A. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* **136**, 3215–3222 (2009).
  138. Qi, X. *et al.* BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6027–6032 (2004).
  139. Hanna, J. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9222–9227 (2010).
  140. Wu, J. *et al.* An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature14413
  141. Kalkan, T. *et al.* Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development* (2017). doi:10.1242/dev.142711
  142. Chang, K. H. & Li, M. Clonal isolation of an intermediate pluripotent stem cell state. *Stem Cells* **31**, 918–927 (2013).
  143. Han, D. W. *et al.* Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. *Cell* **143**, 617–627 (2010).
  144. Cornacchia, D. *et al.* Lipid Deprivation Induces a Stable, Naive-to-Primed Intermediate State of Pluripotency in Human PSCs. *Cell Stem Cell* **25**, 120-136.e10 (2019).
  145. De Iaco, A., Coudray, A., Duc, J. & Trono, D. DPPA2 and DPPA4 are necessary to establish a 2C-like state in mouse embryonic stem cells. *EMBO Rep.* (2019). doi:10.15252/embr.201847382
  146. Eckersley-Maslin, M. *et al.* Dppa2 and Dppa4 directly regulate the Dux-driven zygotic transcriptional program. *Genes Dev.* (2019). doi:10.1101/gad.321174.118
  147. Choi, Y. J. *et al.* Deficiency of microRNA miR-34a expands cell fate potential in pluripotent stem cells. *Science* (80-. ). (2017). doi:10.1126/science.aag1927
  148. Percharde, M. *et al.* A LINE1-Nucleolin Partnership Regulates Early Development and ESC Identity. *Cell* **174**, (2018).
  149. Macfarlan, T. S. *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature11244
  150. Jaenisch, R. Challenging Stem Cells. *Cell* **173**, 1063–1065 (2018).
  151. Yang, J. *et al.* Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature* **550**, 393–397

- (2017).
152. Yang, Y. *et al.* Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.02.005
  153. Gao, X. *et al.* Establishment of porcine and human expanded potential stem cells. *Nat. Cell Biol.* **21**, 687–699 (2019).
  154. Zhao, L. *et al.* Establishment of bovine expanded potential stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2018505118 (2021).
  155. Xue, Z. *et al.* Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* **500**, 593–597 (2013).
  156. Li, H. *et al.* Rapid generation of gene-targeted EPS-derived mouse models through tetraploid complementation. *Protein Cell* **10**, 20–30 (2019).
  157. Ohinata, Y. *et al.* A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell* **137**, 571–584 (2009).
  158. Hayashi, K. *et al.* Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science (80-. )*. **338**, 971–975 (2012).
  159. Yu, L. *et al.* Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification. *Cell Stem Cell* **28**, 550-567.e12 (2021).
  160. Gardner, R. L., Lyon, M. F., Evans, E. P. & Burtenshaw, M. D. Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **VOL. 88**, 349–363 (1985).
  161. Morgani, S., Nichols, J. & Hadjantonakis, A. K. The many faces of Pluripotency: In vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Developmental Biology* (2017). doi:10.1186/s12861-017-0150-4
  162. Smith, A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development* **144**, 365–373 (2017).
  163. Du, P. *et al.* An Intermediate Pluripotent State Controlled by MicroRNAs Is Required for the Naive-to-Primed Stem Cell Transition. *Cell Stem Cell* **22**, 851-864.e5 (2018).
  164. Bao, S. *et al.* Derivation of hypermethylated pluripotent embryonic stem cells with high potency. *Cell Res.* (2018). doi:10.1038/cr.2017.134
  165. Tsukiyama, T. & Ohinata, Y. A Modified episc culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. *PLoS One* **9**, e95329

- (2014).
166. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S. & Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* **146**, 519–532 (2011).
  167. Zhou, Q. *et al.* Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells in Vitro. *Cell Stem Cell* (2016). doi:10.1016/j.stem.2016.01.017
  168. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
  169. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
  170. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* (80-. ). **318**, 1917–1920 (2007).
  171. Kyttälä, A. *et al.* Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSC Differentiation Potential. *Stem Cell Reports* **6**, 200–212 (2016).
  172. Chin, M. H., Pellegrini, M., Plath, K. & Lowry, W. E. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* (2010). doi:10.1016/j.stem.2010.06.019
  173. Narsinh, K. H., Plews, J. & Wu, J. C. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: Fraternal or identical twins? *Molecular Therapy* (2011). doi:10.1038/mt.2011.41
  174. Bilic, J. & Izpisua Belmonte, J. C. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: Close enough or yet too far apart? *Stem Cells* (2012). doi:10.1002/stem.700
  175. Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell* (2012). doi:10.1016/j.stem.2012.05.005
  176. Takahashi, K. & Yamanaka, S. A developmental framework for induced pluripotency. *Development (Cambridge)* **142**, 3274–3285 (2015).
  177. Robinton, D. A. & Daley, G. Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* **481**, 295–305 (2012).
  178. Malik, N. & Rao, M. S. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol. Biol.* **997**, 23–33 (2013).

179. Rony, I. K. *et al.* Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif.* **48**, 140–56 (2015).
180. Hou P *et al.* Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science (80-. )*. **341**, 651–654 (2013).
181. Bosnali, M. & Edenhofer, F. Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2. *Biol. Chem.* **389**, 851–61 (2008).
182. Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M. & Blelloch, R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* **27**, 459–61 (2009).
183. Melton, C., Judson, R. L. & Blelloch, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature08725
184. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* (2008). doi:10.1038/nbt1418
185. Li, Y. *et al.* Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* (2011). doi:10.1038/cr.2010.142
186. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (80-. )*. (2008). doi:10.1126/science.1164270
187. Handyside, A., Hooper, M. L., Kaufman, M. H. & Wilmut, I. Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. *Roux's Arch. Dev. Biol.* (1987). doi:10.1007/BF00376313
188. Ezashi, T., Yuan, Y. & Roberts, R. M. Pluripotent Stem Cells from Domesticated Mammals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **4**, 223–53 (2016).
189. Behboodi, E. *et al.* Establishment of Goat Embryonic Stem Cells From In Vivo Produced Blastocyst-Stage Embryos. **211**, 202–211 (2011).
190. Zhao, Y. *et al.* Derivation and characterization of ovine embryonic stem-like cell lines in semi-defined medium without feeder cells. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* (2011). doi:10.1002/jez.715
191. Telugu, B. P. V. L. *et al.* Leukemia Inhibitory Factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos. *J. Biol. Chem.* (2011). doi:10.1074/jbc.M111.229468

192. Wu, X. *et al.* Establishment of bovine embryonic stem cells after knockdown of CDX2. *Nat. Publ. Gr.* **6**, 1–12 (2016).
193. Bogliotti, Y. S. *et al.* Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 2090–2095 (2018).
194. Xiang, J. *et al.* LCDM medium supports the derivation of bovine extended pluripotent stem cells with embryonic and extraembryonic potency in bovine–mouse chimeras from iPSCs and bovine fetal fibroblasts. *FEBS J.* (2021). doi:10.1111/febs.15744
195. Su, Y. *et al.* Establishment of Bovine-Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, Vol. 22, Page 10489 **22**, 10489 (2021).
196. Choi, K. H. *et al.* Chemically Defined Media Can Maintain Pig Pluripotency Network In Vitro. *Stem Cell Reports* **13**, 221–234 (2019).
197. Vilarino, M. *et al.* Derivation of sheep embryonic stem cells under optimized conditions. *Reproduction* **160**, 761–772 (2020).
198. Maruotti, J. *et al.* Efficient derivation of bovine embryonic stem cells needs more than active core pluripotency factors. *Mol. Reprod. Dev.* **79**, 461–77 (2012).
199. Kuhl, M. *et al.* The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279–283 (2000).
200. G, S. & V, B. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 518–525 (2007).
201. He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* (2004). doi:10.1242/dev.01117
202. JB, W. & R, H. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**, 4421–4436 (2005).
203. Komiya, Y. & Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68 (2008).
204. MD, G. & R, N. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**, 22429–22433 (2006).
205. H, Y. *et al.* Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J. Biol. Chem.* **274**, 10681–10684 (1999).
206. J, M. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* **7**, 801–809 (2001).
207. S, H., T, R., M, H. & P, C. Beta-catenin and Tefs in mammary development and cancer. *J.*

- Mammary Gland Biol. Neoplasia* **8**, 145–158 (2003).
208. T, R. & H, C. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850 (2005).
209. Berge, D. Ten *et al.* Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat. Cell Biol.* (2011). doi:10.1038/ncb2314
210. Marson, A. *et al.* Wnt Signaling Promotes Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* (2008). doi:10.1016/j.stem.2008.06.019
211. Miyabayashi, T. *et al.* Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0701331104
212. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **10**, 55–63 (2004).
213. F, L., E, P., S, P. & MP, C. Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. *Cell Stem Cell* **3**, 493–507 (2008).
214. Wang, C. *et al.* Wnt3a Activates the WNT-YAP/TAZ Pathway to Sustain CDX2 Expression in Bovine Trophoblast Stem Cells. *DNA Cell Biol.* **38**, 410–422 (2019).
215. Xu, Z. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6382–E6390 (2016).
216. M, R., GG, S. & A, S. Capacitation of human naïve pluripotent stem cells for multi-lineage differentiation. *Development* **146**, (2019).
217. Kim *et al.* Modulation of  $\beta$ -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Commun.* (2013). doi:10.1038/ncomms3403
218. Sumi, T., Oki, S., Kitajima, K. & Meno, C. Epiblast Ground State Is Controlled by Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Postimplantation Mouse Embryo and Epiblast Stem Cells. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0063378
219. Tsakiridis, A. *et al.* Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. *Development* (2014). doi:10.1242/dev.101014
220. Kurek, D. *et al.* Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem cell reports* **4**, 114–128 (2015).

221. Sugimoto, M. *et al.* A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by wnt inhibition. *Stem cell reports* **4**, 744–57 (2015).
222. X, Z., JP, C., B, R. & QL, Y. Cytoplasmic and Nuclear TAZ Exert Distinct Functions in Regulating Primed Pluripotency. *Stem cell reports* **9**, 732–741 (2017).
223. Gafni, O. *et al.* Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**, 282–286 (2013).
224. C.H. Waddington. *The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology.* (George Allen & Unwin, 1957).
225. Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nat. 2007 4477143* **447**, 425–432 (2007).
226. Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* **441**, 1061–1067 (2006).
227. Sridharan, R. *et al.* Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1 $\gamma$  in reprogramming to pluripotency. *Nat. Cell Biol. 2013 157* **15**, 872–882 (2013).
228. Matoba, S. *et al.* Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell* (2014). doi:10.1016/j.cell.2014.09.055
229. Chung, Y. G. *et al.* Histone Demethylase Expression Enhances Human Somatic Cell Nuclear Transfer Efficiency and Promotes Derivation of Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 758–766 (2015).
230. Liu, Z. *et al.* Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* **172**, 881-887.e7 (2018).
231. Ruan, D. *et al.* XIST Derepression in Active X Chromosome Hinders Pig Somatic Cell Nuclear Transfer. *Stem Cell Reports* **10**, 494 (2018).
232. Y, Z. *et al.* Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology* **70**, 1469–1477 (2018).
233. Zhang, J. *et al.* MicroRNA-125b is a key epigenetic regulatory factor that promotes nuclear transfer reprogramming. *J. Biol. Chem.* **292**, 15916 (2017).
234. Liu, W. *et al.* Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov.* **2**,



- 1–15 (2016).
235. Zhang, Z. *et al.* Down-Regulation of H3K4me3 by MM-102 Facilitates Epigenetic Reprogramming of Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 1529–1540 (2018).
236. Zhou, C. *et al.* Transcriptional memory inherited from donor cells is a developmental defect of bovine cloned embryos. *FASEB J.* **34**, 1637–1651 (2020).
237. Xie, B. *et al.* Histone H3 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear reprogramming. *Reproduction* **151**, 9–16 (2016).
238. Zhou, C. *et al.* H3K27me3 is an epigenetic barrier while KDM6A overexpression improves nuclear reprogramming efficiency. *FASEB J.* **33**, 4638–4652 (2019).
239. K, I. *et al.* Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* **330**, 496–499 (2010).
240. R, C. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039–1043 (2002).
241. K, P. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**, 131–135 (2003).
242. H, O. *et al.* RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 992–1001 (2014).
243. Matoba, S. *et al.* Loss of H3K27me3 Imprinting in Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Disrupts Post-Implantation Development. *Cell Stem Cell* **23**, 343-354.e5 (2018).
244. CR, L., ME, W. & MC, G. Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* **81**, 183–193 (2014).
245. Min, B. *et al.* Transcriptomic features of bovine blastocysts derived by somatic cell nuclear transfer. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **5**, 2527–2538 (2015).
246. Constant, F. *et al.* Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol. Reprod.* **75**, 122–130 (2006).
247. Hill, J. R. *et al.* Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* **62**, 1135–1140 (2000).
248. Kang, Y. *et al.* Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.* **21**, 1092–1100 (2002).

249. Ao, Z., Liu, D., Cai, G., Wu, Z. & Li, Z. [Placental developmental defects in cloned mammalian animals]. *Yi chuan = Hered.* **38**, 402–410 (2016).
250. Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**, 424–429 (2011).
251. Ludwig, T. E. *et al.* Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat. Methods* **3**, 637–646 (2006).
252. Llames, S., García-Pérez, E., Meana, Á., Larcher, F. & Del Río, M. Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **21**, 345–353 (2015).
253. Soto, D. A. & Ross, P. J. Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering. *Transgenic Res.* **25**, (2016).
254. Williams, D. K. *et al.* Genetic engineering a large animal model of human hypophosphatasia in sheep. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
255. Roberts, R., Yuan, Y., Genovese, N. & Ezashi, T. Livestock models for exploiting the promise of pluripotent stem cells. *ILAR J.* (2015). doi:10.1093/ilar/ilv005
256. Hikabe, O. *et al.* Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* **539**, 299–303 (2016).
257. Goszczynski, D. E. *et al.* In vitro breeding: application of embryonic stem cells to animal production†. *Biol. Reprod.* **100**, 885–895 (2018).
258. Kobayashi, T. *et al.* Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. *Cell* **142**, 787–799 (2010).
259. Ideta, A. *et al.* Generation of exogenous germ cells in the ovaries of sterile NANOS3-null beef cattle. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
260. Tong, C., Huang, G., Ashton, C., Li, P. & Ying, Q. L. Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* **6**, 827–844 (2011).
261. Ludwig, T. E. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**, 185–187 (2006).
262. Gokulakrishnan, P., Kumar, R. R., Sharma, B. D., Mendiratta, S. K. & Sharma, D. Sex determination of cattle meat by polymerase chain reaction amplification of the DEAD box protein (DDX3X/DDX3Y) gene. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **25**, 733–737 (2012).
263. Adewumi, O. *et al.* Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* **25**, 803–816 (2007).

264. Becker, K. A. *et al.* Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J. Cell. Physiol.* **209**, 883–893 (2006).
265. Itskovitz-Eldor, J. *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* **6**, 88–95 (2000).
266. Xu, C. *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 971–4 (2001).
267. Amit, M., Shariki, C., Margulets, V. & Itskovitz-Eldor, J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* **70**, 837–45 (2004).
268. Braam, S. R. *et al.* Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via  $\alpha V\beta 5$  Integrin. *Stem Cells* **26**, 2257–2265 (2008).
269. Beattie, G. M. *et al.* Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* **23**, 489–95 (2005).
270. Pauklin, S. & Vallier, L. Activin/nodal signalling in stem cells. *Development (Cambridge)* **142**, 607–619 (2015).
271. Vallier, L. *et al.* Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* **136**, 1339–49 (2009).
272. Levenstein, M. E. *et al.* Basic FGF Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells* (2005).
273. Greber, B. *et al.* Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **6**, 215–226 (2010).
274. Kaya-Okur, H. S. *et al.* CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
275. Skene, P. J. & Henikoff, S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife* **6**, (2017).
276. Mignone, F. & Pesole, G. mRNA Untranslated Regions (UTRs). in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2011). doi:10.1002/9780470015902.a0005009.pub2
277. Vojvoda Zeljko, T., Ugarković, Đ. & Pezer, Ž. Differential enrichment of H3K9me3 at annotated satellite DNA repeats in human cell lines and during fetal development in mouse. *Epigenetics and Chromatin* **14**, 1–16 (2021).
278. Cooper, S. *et al.* Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells

- reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep.* **7**, 1456–1470 (2014).
279. Pauler, F. M. *et al.* H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome. *Genome Res.* **19**, 221–233 (2009).
280. Peters, A. H. F. M. *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* **12**, 1577–1589 (2003).
281. Saksouk, N. *et al.* Redundant mechanisms to form silent chromatin at pericentromeric regions rely on BEND3 and DNA methylation. *Mol. Cell* **56**, 580–594 (2014).
282. Alder, O. *et al.* Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development* **137**, 2483–2492 (2010).
283. Bilodeau, S., Kagey, M. H., Frampton, G. M., Rahl, P. B. & Young, R. A. SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev.* **23**, 2484–2489 (2009).
284. Hawkins, R. D. *et al.* Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell* **6**, 479–491 (2010).
285. Ringrose, L. & Paro, R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 413–443 (2004).
286. Lee, T. I. *et al.* Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301–313 (2006).
287. Boyer, L. A. *et al.* Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nat.* 2006 4417091 **441**, 349–353 (2006).
288. Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* **8**, 532–538 (2006).
289. Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315–326 (2006).
290. Soares, L. M. *et al.* Determinants of Histone H3K4 Methylation Patterns. *Mol. Cell* **68**, 773–785.e6 (2017).
291. Roadmap Epigenomics Consortium *et al.* Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317–329 (2015).
292. Francis, G. L. Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications. *Cytotechnology* **62**, 1–16 (2010).

293. Chen, K. G., Mallon, B. S., McKay, R. D. G. & Robey, P. G. Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics. doi:10.1016/j.stem.2013.12.005
294. Liu, K. *et al.* KSR-Based Medium Improves the Generation of High-Quality Mouse iPS Cells. *PLoS One* **9**, e105309 (2014).
295. Garcia-Gonzalo, F. R. & Belmonte, J. C. I. Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal. *PLoS One* **3**, e1384 (2008).
296. Muñoz, M. *et al.* Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. *Theriogenology* **69**, 1159–64 (2008).
297. Marks, H. *et al.* The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* **149**, 590–604 (2012).
298. Efroni, S. *et al.* Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 437–447 (2008).
299. Torres-Padilla, M. E. & Chambers, I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development* **141**, 2173–2181 (2014).
300. Loh, K. M. & Lim, B. A Precarious Balance: Pluripotency Factors as Lineage Specifiers. *Cell Stem Cell* **8**, 363–369 (2011).
301. Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460**, 118–122 (2009).
302. Villa-Diaz, L. G., Ross, A. M., Lahann, J. & Krebsbach, P. H. The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. doi:10.1002/stem.1260
303. Orkin, R. W. *et al.* A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J. Exp. Med.* **145**, 204–220 (1977).
304. Kleinman, H. K. *et al.* Isolation and Characterization of Type IV Procollagen, Laminin, and Heparan Sulfate Proteoglycan from the EHS Sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188–6193 (1982).
305. Harkness, L., Chen, X., Gillard, M., Gray, P. P. & Davies, A. M. Media composition modulates human embryonic stem cell morphology and may influence preferential lineage differentiation potential. *PLoS One* **14**, (2019).
306. Tilghman, R. W. & Parsons, J. T. Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 45–52 (2008).
307. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell shape,

- cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495 (2004).
308. James, D., Levine, A. J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* **132**, 1273–82 (2005).
309. Vallier, L., Reynolds, D. & Pedersen, R. A. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev. Biol.* **275**, 403–21 (2004).
310. Xiao, L., Yuan, X. & Sharkis, S. J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 1476–1486 (2006).
311. Xu, R. H. *et al.* NANOG Is a Direct Target of TGFβ/Activin-Mediated SMAD Signaling in Human ESCs. *Cell Stem Cell* **3**, 196–206 (2008).
312. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4495–509 (2005).
313. Li, J. *et al.* MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation.* **75**, 299–307 (2007).
314. Dvorak, P. *et al.* Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**, 1200–11 (2005).
315. Denicol, A. C. *et al.* The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage commitment and promotes survival of the preimplantation embryo. *FASEB J.* **28**, 3975–86 (2014).
316. Tribulo, P., Leão, B. C. da S., Lehloenya, K. C., Mingoti, G. Z. & Hansen, P. J. Consequences of endogenous and exogenous WNT signaling for development of the preimplantation bovine embryo. *Biol. Reprod.* **96**, 1129–1141 (2017).
317. Y, X. *et al.* Importance of WNT-dependent signaling for derivation and maintenance of primed pluripotent bovine embryonic stem cells†. *Biol. Reprod.* **105**, (2021).
318. Niemann, H., Tian, X. C., King, W. A. & Lee, R. S. F. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* **135**, 151–163 (2008).
319. Li, X., Kato, Y. & Tsunoda, Y. Comparative analysis of development-related gene expression in mouse preimplantation embryos with different developmental potential. *Mol.*

- Reprod. Dev.* **72**, 152–160 (2005).
320. Bortvin, A. *et al.* Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* **130**, 1673–1680 (2003).
321. Min, B., Cho, S., Park, J. S., Jeon, K. & Kang, Y. K. The HIST1 locus escapes reprogramming in cloned bovine embryos. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **6**, 1365–1371 (2016).
322. Zhang, L. *et al.* RNA sequencing revealed the abnormal transcriptional profile in cloned bovine embryos. *Int. J. Biol. Macromol.* **150**, 492–500 (2020).
323. Kaufman, M. H., Robertson, E. J., Handyside, A. H. & Evans, M. J. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *Development* **73**, (1983).
324. Robertson, E. J., Evans, M. J. & Kaufman, M. H. X-chromosome instability in pluripotential stem cell lines derived from parthenogenetic embryos. *Development* **74**, (1983).
325. Kennedy, D. Evidence of A Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived From a Cloned Blastocyst. *Patient-Specific Embryonic Stem Cells Deriv. from Hum. SCNT Blastocysts* **303**, 1777 (2006).
326. Lin, G. *et al.* A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following in vitro fertilization procedure. *Cell Res.* **17**, 999–1007 (2007).
327. Mai, Q. *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res.* **17**, 1008–1019 (2007).
328. Revazova, E. S. *et al.* Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells* **9**, 432–449 (2007).
329. Kishigami, S., Wakayama, S., van Thuan, N. & Wakayama, T. Cloned mice and embryonic stem cell establishment from adult somatic cells. *Human cell : official journal of Human Cell Research Society* **19**, 2–10 (2006).
330. Munsie, M. J. *et al.* Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr. Biol.* **10**, 989–992 (2000).
331. Rideout, W. M., Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q. & Jaenisch, R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* **109**, 17–27 (2002).
332. Wakayama, T. *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult

- somatic cells by nuclear transfer. *Science (80-. )*. **292**, 740–743 (2001).
333. Byrne, J. A. *et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* **450**, 497–502 (2007).
334. Sparman, M. *et al.* Epigenetic reprogramming by somatic cell nuclear transfer in primates. *Stem Cells* **27**, 1255–1264 (2009).
335. Chung, Y. G. *et al.* Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell* **14**, 777–780 (2014).
336. Noggle, S. *et al.* Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* **478**, 70–75 (2011).
337. Tachibana, M. *et al.* Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* **153**, 1228–1238 (2013).
338. Yamada, M. *et al.* Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* **510**, 533–536 (2014).
339. Leeb, M. & Wutz, A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nat. 2011 4797371* **479**, 131–134 (2011).
340. Revazova, E. S. *et al.* HLA homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells* **10**, 11–24 (2008).
341. Ju, J. Y. *et al.* Establishment of stem cell lines from nuclear transferred and parthenogenetically activated mouse oocytes for therapeutic cloning. *Fertil. Steril.* **89**, (2008).
342. Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H. & Gelber, C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *Biotechniques* **43**, 575–586 (2007).
343. Zhao, M. T. *et al.* Molecular and functional resemblance of differentiated cells derived from isogenic human iPSCs and SCNT-derived ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E11111–E11120 (2017).
344. Renard, J. P. *et al.* Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet (London, England)* **353**, 1489–1491 (1999).
345. Keefer, C. L. *et al.* Generation of Dwarf Goat (*Capra hircus*) Clones Following Nuclear Transfer with Transfected and Nontransfected Fetal Fibroblasts and In Vitro-Matured Oocytes. *Biol. Reprod.* **64**, 849–856 (2001).



346. Ogonuki, N. *et al.* Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.* **30**, 253–254 (2002).
347. Boiani, M., Eckardt, S., Schöler, H. R. & John McLaughlin, K. Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency. *Genes Dev.* **16**, 1209–1219 (2002).
348. Cell Adhesion and the Extracellular Matrix. *Goodman's Med. Cell Biol.* 203–247 (2021). doi:10.1016/B978-0-12-817927-7.00007-7
349. Brambrink, T., Hochedlinger, K., Bell, G. & Jaenisch, R. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 933–938 (2006).
350. S, W. *et al.* Equivalency of nuclear transfer-derived embryonic stem cells to those derived from fertilized mouse blastocysts. *Stem Cells* **24**, 2023–2033 (2006).
351. Ma, H. *et al.* Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* **511**, 177–183 (2014).
352. Gerri, C. *et al.* Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature* **587**, (2020).
353. Gunne-Braden, A. *et al.* GATA3 mediates a fast, irreversible commitment to BMP4-driven differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **26**, 693–706 (2020).
354. Home, P. *et al.* GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* **284**, (2009).
355. Lin, T. *et al.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* **7**, 165–171 (2005).
356. Qin, H. *et al.* Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 5842–5852 (2007).
357. Ralston, A. *et al.* Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137**, 395–403 (2010).
358. Xiao, L. *et al.* Deciphering a distinct regulatory network of TEAD4, CDX2 and GATA3 in humans for trophoblast transition from embryonic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* **1867**, 118736 (2020).
359. Klein, D. C. & Hainer, S. J. Chromatin regulation and dynamics in stem cells. in *Current Topics in Developmental Biology* **138**, 1–71 (Academic Press Inc., 2020).
360. Voigt, P., Tee, W. W. & Reinberg, D. A double take on bivalent promoters. *Genes and*

- Development* **27**, 1318–1338 (2013).
361. Kilpinen, H. *et al.* Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature* **546**, 370–375 (2017).
362. Rouhani, F. *et al.* Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Genet.* **10**, (2014).
363. Zhao, M. T. *et al.* Cell type-specific chromatin signatures underline regulatory DNA elements in human induced pluripotent stem cells and somatic cells. *Circ. Res.* **121**, 1237–1250 (2017).
364. Tian, X. C., Kubota, C., Enright, B. & Yang, X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer-biological factors. (2003).
365. Kou, Z. *et al.* Mice cloned from induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Biol. Reprod.* **83**, 238–43 (2010).

Esta versión del manuscrito es la versión final, habiendo incorporado las sugerencias realizadas por los jurados.



Alumna: Dra. Micaela Navarro



Director: Dr. Adrián A. Mutto