

Título completo: Desarrollo de estrategias de selección de ovocitos bovinos para mejorar la producción *in vitro* de embriones y la transgénesis animal.

Autora: Opizzo Balza, Bianca Ana. Departamento de Biología Molecular/INBIAS. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Palabras clave: Ovocitos/ ovarios/ bovinos/ selección/ producción *in vitro*/ primer cuerpo polar/ transgénesis/ *Sleeping Beauty*.

Resumen en español: Los sistemas de producción *in vitro* (PIV) de embriones se utilizan tanto para fines productivos como para generar embriones necesarios para la investigación científica. Sin embargo, la eficiencia de la PIV de embriones en especies ganaderas, medida como la proporción de ovocitos inmaduros que alcanzan el estadio de blastocisto, rara vez supera el 30-40%. En bovinos, una de las principales razones de este bajo porcentaje tiene que ver con la heterogeneidad en la calidad de los ovocitos que provienen de ovarios de animales sacrificados en mataderos. Para mejorar la eficiencia de la PIV resulta necesario identificar variables predictivas del estado funcional de los ovocitos antes de la maduración *in vitro* (MIV), evaluar la capacidad de maduración de estos y las características posteriores a la MIV. Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo es realizar una caracterización morfológica, cuantitativa y biológica de ovarios y ovocitos provenientes de animales destinados a faena con el fin de establecer métodos sencillos y no invasivos de selección de ovocitos competentes para ser utilizados en tecnologías de reproducción *in vitro*. Fue posible caracterizar morfológica y biológicamente tanto los ovarios como sus complejos cúmulus-ovocito (COCs) y ovocitos provenientes de un frigorífico local. Alrededor del 90 % resultaron ser ovocitos y COCs de buena calidad para ser utilizados en ensayos de PIV. Posterior a la MIV, las medidas determinadas de área, perímetro y diámetro del ooplasma, espesor de la zona pelúcida (ZP) y expansión de las células del cúmulus (CC) fueron significativamente superiores a las determinadas previo a la MIV. También se evaluó la incidencia de la morfología del primer cuerpo polar (CP) en parámetros como viabilidad, producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y distribución de gránulos corticales (GC). Los resultados mostraron que la morfología del primer CP está relacionada con las variables indicativas de calidad mencionadas y, por lo tanto, pudo concluirse que la morfología del primer cuerpo polar es un método relativamente sencillo y no invasivo que permite identificar ovocitos bovinos maduros de calidad, supuestamente con mayor probabilidad de promover el desarrollo embrionario. Finalmente, se desarrolló un sistema transgénico en células bovinas en cultivo, basado en el transposón *Sleeping Beauty*, para mediar la integración genómica de secuencias que codifican la desaturasa mFAT2. Los vertebrados son incapaces de sintetizar ácidos grasos (AG) poliinsaturados. Contrariamente, el nematodo *C. elegans* puede sintetizarlos ya que cuenta con las desaturasas necesarias para dicho proceso. En este trabajo, se logró transfectar con éxito células bovinas MAC-T con el gen de la desaturasa mencionada, mediante el sistema transposón *Sleeping Beauty*. Las líneas celulares bovinas transgénicas que expresaron establemente la enzima mFAT2 mostraron un perfil lipídico con presencia de AG poliinsaturados. Sobre la base de todos estos resultados se espera lograr en un futuro una mejor eficiencia en las tecnologías de reproducción *in vitro* en especies ganaderas mediante una selección cuidadosa de ovocitos previo a la MIV y luego de la MIV identificar los de mejor calidad de acuerdo a la

morfología del primer CP. Sumado a esto, a partir del sistema transgénico desarrollado podrían obtenerse animales portadores del gen de la desaturasa para producir leche con un mejor perfil lipídico para el consumo humano.

Resumen en inglés: *In vitro* embryo production (IVP) has been utilized for both productive and scientific purposes. However, the efficiency of IVP in livestock species, as measured by the proportion of immature oocytes reaching the blastocyst stage, rarely exceeds 30-40%. In cattle, one of the main reasons for this low percentage is due to the heterogeneous oocytes quality, especially considering that the ovaries used in most cases come from slaughterhouses. To enhance the efficiency of IVP, it is crucial to identify predictive variables of the maturation capacity and functional state of oocytes before *in vitro* maturation (IVM). Based on this precedent, a morphological, quantitative and biological characterization of ovaries and oocytes was carried out from slaughtered animals. The main objective was to establish simple and non-invasive methods for selecting competent oocytes to be used in breeding technologies in *in vitro* reproduction. It was possible to characterize morphologically and biologically the ovaries and their COCs and oocytes from the local slaughterhouse. Around 90% turned out to be oocytes and COCs of good quality to be used in IVP trials. After IVM, the measurements determined for area, perimeter and diameter of the ooplasm, thickness of the zona pellucida (ZP) and expansion of cumulus cells (CC) were significantly higher than those determined before IVM. The influence of the first polar body (PB) morphology was also evaluated in parameters such as viability, production of reactive oxygen species (ROS) and distribution of cortical granules (CG). The results showed that the first PB morphology is related to the aforementioned indicative quality variables. Therefore, it could be concluded that the first PB morphology is a relatively simple and non-invasive method that would allow selecting quality mature bovine oocytes with a greater probability of promoting embryonic development. Finally, a transgenic system was developed in cultured bovine cells, based on the Sleeping Beauty transposon, to mediate the genomic integration of sequences that encode the mFAT2 desaturase. Vertebrates are incapable of synthesizing polyunsaturated fatty acids (PUFA). On the contrary, the nematode *C. elegans* can synthesize them since it has the necessary desaturases for this process. In this work, bovine MAC-T cells were successfully transfected with the aforementioned desaturase gene, using the Sleeping Beauty transposon system. Transgenic bovine cell lines that stably expressed the mFAT2 enzyme showed a lipid profile with the presence of PUFAs. Based on all these results, it is expected to achieve better efficiency in *in vitro* reproduction technologies in livestock species in the future through careful selection of oocytes prior to their IVM and subsequently according to the morphology of the first PB. In addition to this, from the transgenic system developed, animals carrying the desaturase gene could be obtained to produce improved milk for human consumption.

Evaluado por pares: SI.

Fecha: 23/02/2024.

Formato: pdf

Idioma: español.

Financiamiento: UNRC, CONICET, FONCyT.

Condiciones de uso: CC BY-NC-SA

Informo que, de acuerdo a lo que prescribe la Ley N° 26.899(*) (2013), su Reglamento Operativo (Resolución 753-E/2016) y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Resolución del Consejo Superior N° 202/2021), este documento es resultado del financiamiento total o parcial otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto”. (*) La Ley N° 26.899 define por financiamiento total o parcial con fondos públicos, a la inversión que el Estado realiza ya sea de forma directa, (como el pago de salarios, incentivos, subsidios, etc.), o indirecta (el acceso a bibliografía científica adquirida con fondos públicos, la utilización de la infraestructura de las instituciones y organismos, el uso de insumos y equipamientos, el financiamiento total o parcial de viajes, etc.) para el desarrollo de la actividad científica, tecnológica y de innovación.



Opizzo Balza, Bianca Ana



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE RÍO CUARTO

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN DE
OVOCITOS BOVINOS PARA MEJORAR LA
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES Y LA
TRANSGÉNESIS ANIMAL

Bianca Ana Opizzo Balza

Febrero de 2024



CREER...CREAR...CRECER

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-
QUÍMICAS y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Biológicas

**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN DE
OVOCITOS BOVINOS PARA MEJORAR LA
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES Y LA
TRANSGÉNESIS ANIMAL**

Mic. Bianca Ana Opizzo Balza

Director: Dr. Pablo Bosch

Co-directora: Dra. Ana Cecilia Liaudat

Río Cuarto, febrero de 2024



A mi hijo Vittorio



COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dr. Matías Santiago Pellegrino

Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma:.....

Aclaración:.....

Dr. Rafael Fernández-Martin

Universidad de Buenos Aires

Firma:.....

Aclaración:.....

Dr. Marcelo Miragaya

Universidad de Buenos Aires

Firma:.....

Aclaración:.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:.....

Calificación:.....

Agradecimientos

A mi hijo Vitto, por hacerme feliz todos los días. Por ser mi motor para crecer. Por enseñarme lo valioso del tiempo compartido y ordenar mis prioridades. A mi compañero de vida, Pablo. Por alentarme y apoyarme en cada paso. Por ser mi par. Los amo!!!

A mi mamá y mi papá, por los valores inculcados. Por estar siempre presentes, en las buenas y en las malas. Por festejar cada logro como propio y por ser el sostén de mi familia. Gracias!!!

A mis hermanxs. Por las risas y momentos compartidos. A Evita, Jaz y Laura, también por estar presentes siempre para Vitto y para mí. Me alegran el alma!

A mi cuñado Franco, por estar disponible todos los miércoles durante un año seguido para llevarnos a Vitto y a mí a la uni.

A todxs mis amigxs, lxs de siempre, lxs de la carrera, lxs más recientes. Un gracias inmenso por ser un cable a tierra.

A mis compañeros y compañeras de trabajo del 23 y del 10, por cada día compartido, por la ayuda recibida, los mates y la catarsis. A Pablo y Nancy por dejarme ser parte de su equipo y permitirme crecer, por las enseñanzas en este camino, por la libertad que siempre tuve para trabajar. Un especial agradecimiento a Ceci por siempre estar al pie del cañón, por su ayuda desinteresada, por su escucha y sus consejos. Mil gracias!!!

A la gente del Dpto. de Biología Molecular, por cada colaboración en estos años.

A todas las personas de la cátedra de Fisiología Animal, gracias por permitirme ser parte del equipo y por todo lo aprendido.

A los miembros del jurado, Matías, Marcelo y Rafael. Gracias por el seguimiento durante mi doctorado, por enriquecer mi trabajo con sus aportes, por el valioso tiempo brindado para cumplir con mis peticiones.

A mi querida Universidad Nacional de Río Cuarto, institución pública, gratuita y de calidad, donde pude realizar mi formación de grado y posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el sustento económico para realizar las tareas de investigación mediante becas y subsidios.

No importa cuán pequeño sea tu paso, siempre es un paso hacia adelante.

Rosalyn Yalow

INDICE

| | |
|---|------|
| Índice de tablas | vii |
| Índice de figuras | viii |
| Abreviaturas | ix |
| Resumen en español | xi |
| Resumen en inglés | xiii |
| 1. Introducción. | 1 |
| 1.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones y caracterización morfológica de ovarios y ovocitos. | 1 |
| 1.2. Morfología del primer cuerpo polar. | 3 |
| 1.3. Biotecnología Transgénica - Mejoramiento genético del desempeño productivo en vacas lecheras: papel de la desaturasa FAT-2. | 4 |
| 1.4. Transgénesis activa mediada por elementos transponibles. | 8 |
| 1.5. Transposón Sleeping Beauty. | 10 |
| 2. Hipótesis. | 12 |
| 3. Objetivo general. | 13 |
| 3.1. Objetivos específicos. | 13 |
| 4. Materiales y Métodos. | 14 |
| 4.1. Obtención de ovarios. | 14 |
| 4.2. Clasificación morfológica de ovarios. | 14 |
| 4.3. Recolección de complejos cúmulus-ovocitos (COCs). | 15 |
| 4.4. Caracterización de COCs. | 15 |
| 4.4.1. Cobertura. | 16 |
| 4.4.2. Capas de células del cúmulus (CC). | 16 |
| 4.4.3. Compactación de las CC. | 16 |
| 4.4.4. Ooplasma. | 16 |
| 4.4.5. Espesor de la cobertura de las CC. | 17 |
| 4.4.6. Área, perímetro y diámetro del ooplasma. | 18 |
| 4.4.7. Diámetro de la Zona Pelúcida. | 19 |
| 4.5. Caracterización biológica de ovocitos bovinos. | 19 |
| 4.5.1. Integridad del ADN mediante tinción con Hoechst 33342. | 19 |
| 4.5.2. Ensayo de Viabilidad mediante tinción con yoduro de propidio (IP). | 19 |
| 4.5.3. Potencial de membrana mitocondrial mediante tinción con Rodamina 123. | 19 |
| 4.6. Cálculo de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) mediante Image J-Fiji. | 20 |
| 4.7. Maduración <i>in vitro</i> (MIV) de ovocitos bovinos. | 20 |
| 4.8. Clasificación del primer cuerpo polar de ovocitos madurados <i>in vitro</i> según su morfología. | 20 |
| 4.9. Tinción inmunocitoquímica de gránulos corticales para determinar la intensidad de fluorescencia de ovocitos bovinos maduros. | 21 |
| 4.10. Tinción inmunocitoquímica de gránulos corticales para determinar la disposición de los mismos en ovocitos bovinos maduros. | 21 |
| 4.11. Ensayo de Viabilidad de ovocitos maduros mediante tinción con yoduro de propidio. | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.12. Niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) de ovocitos maduros mediante tinción con diacetato de 5-6-carboxi 2,7 diclorodihidrofluoresceína (H2DCFH-DA). | 22 |
| 4.13. Análisis estadístico. | 23 |
| 4.14. Tranfección de células bovinas en cultivo mediante el sistema transposón Sleeping Beauty para mediar la integración genómica de secuencias que codifican una enzima heteróloga (mFAT-2). | 23 |
| 4.14.1. Condiciones de cultivo de MAC-T. | 23 |
| 4.14.2. Congelado y descongelado de líneas celulares bovinas. | 24 |
| 4.14.3. Vectores plasmídicos. | 24 |
| 4.14.4. Cepa bacteriana. | 27 |
| 4.14.5. Obtención de plásmidos. | 27 |
| 4.14.6. Purificación de ADN plasmídico, conservación y cuantificación. | 28 |
| 4.14.7. Curva de selección de antibiótico G418. | 29 |
| 4.14.8. Transfección. | 29 |
| 4.14.9. Obtención de líneas monoclonales transgénicas. | 31 |
| 4.14.10. Extracción de ADN genómico a partir de líneas monoclonales. | 31 |
| 4.14.11. Análisis de la integración del gen de la desaturasa mFAT-2 al genoma bovino por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). | 31 |
| 4.14.12. Determinación de la proporción de ω -6 y ω -3 por cromatografía gaseosa para evaluar la actividad desaturasa en células transgénicas. | 33 |
| 5. Resultados y Discusión. | 35 |
| 5.1. Caracterización de ovarios y ovocitos. | 35 |
| 5.1.1. Caracterización de ovarios según la presencia de estructuras relacionadas al ciclo estral. | 35 |
| 5.1.2. Caracterización de ovarios según el tamaño de los folículos. | 36 |
| 5.1.3. Caracterización de COCs según el revestimiento de los ovocitos por las células del cúmulus. | 38 |
| 5.1.4. Caracterización de COCs según la cantidad de capas y el espesor de las células del cúmulus. | 39 |
| 5.1.5. Caracterización de COCs según el grado de compactación de las células del cúmulus. | 41 |
| 5.1.6. Caracterización de ovocitos según la homogeneidad del ooplasma. | 42 |
| 5.1.7. Caracterización cuantitativa de ovocitos. | 43 |
| 5.1.8. Caracterización biológica de ovocitos. | 44 |
| 5.1.8.1. Integridad del ADN o morfología nuclear. | 44 |
| 5.1.8.2. Viabilidad de ovocitos. | 45 |
| 5.1.8.3. Potencial de membrana mitocondrial. | 45 |
| 5.1.9. Maduración <i>in vitro</i> y determinación del diámetro de ovocitos maduros. | 46 |

| | |
|--|----|
| 5.1.10. Comparación entre las características medidas en ovocitos pre y post MIV. | 47 |
| 5.2. Caracterización morfológica del primer cuerpo polar de ovocitos bovinos maduros y su relación con la calidad ovocitaria. | 48 |
| 5.2.1. Clasificación morfológica del primer cuerpo polar de ovocitos madurados <i>in vitro</i> . | 48 |
| 5.2.2. Estudio de parámetros biológicos indicativos de calidad ovocitaria en relación a los diferentes grados de cuerpo polar en ovocitos madurados <i>in vitro</i> . | 50 |
| 5.2.2.1. Viabilidad celular según grado de cuerpo polar (CP). | 51 |
| 5.2.2.2. Niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) según grado de CP. | 52 |
| 5.2.3. Intensidad de fluorescencia de gránulos corticales según el grado de cuerpo polar de ovocitos bovinos. | 54 |
| 5.2.4. Disposición de gránulos corticales según el grado de cuerpo polar de ovocitos bovinos. | 55 |
| 5.3. Desarrollo de un sistema transgénico en células bovinas, basado en el transposón Sleeping Beauty, para mediar la integración genómica de secuencias que codifican la enzima heteróloga mFAT2. | 58 |
| 5.3.1. Curva de selección de antibióticos. | 58 |
| 5.3.2. Transfección de MAC-T, selección y expansión. | 58 |
| 5.3.3. Confirmación de la presencia del transgén fat-2 en el genoma bovino mediante PCR. | 60 |
| 5.3.4. Análisis del perfil de ácidos grasos por Cromatografía Gaseosa para estudiar la funcionalidad de la enzima desaturasa mFAT-2. | 62 |
| 6. Conclusiones. | 66 |
| 7. Bibliografía. | 68 |
| 8. Anexos. | 79 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabla N° 1 | Resumen de indicadores morfológicos y visuales de competencia ovocitaria (Aguila y col., 2020). | 2 |
| Tabla N° 2 | Aportes de ácidos grasos (AG) por consumo de leche de vaca y su dosis diariarecomendada. | 6 |
| Tabla N° 3 | Diseño de experimentos de transfección. | 30 |
| Tabla N° 4 | Mezclas de reacción para PCR. | 32 |
| Tabla N° 5 | Descripción de ciclos de PCR. | 32 |
| Tabla N° 6 | Porcentaje de ovarios según la presencia de cuerpo lúteo (CL), folículo dominante (FD), ambas estructuras (CL+FD) o ausencia de ellas (NO). | 35 |
| Tabla N° 7 | Porcentajes de folículos ováricos según rango de tamaño. | 37 |
| Tabla N° 8 | Porcentajes de complejos cúmulus-ovocitos según cobertura del ovocito por las células del cúmulus. | 38 |
| Tabla N° 9 | Promedios de las determinaciones de espesor de las capas de células del cúmulus de complejos cúmulus-ovocitos con cantidad de capas 1, 2 y 3. | 40 |
| Tabla N° 10 | Grado de compactación de las células del cúmulus. | 41 |
| Tabla N° 11 | Parámetros físicos determinados en ovocitos desnudos. | 43 |
| Tabla N° 12 | Comparación entre mediciones realizadas previas y posteriores a la maduración <i>in vitro</i> en complejos cúmulus-ovocitos y ovocitos desnudos. | 47 |
| Tabla N° 13 | Intensidad de fluorescencia corregida de gránulos corticales de ovocitos teñidos con aglutinina de <i>lens culinaris</i> conjugada con isotiocianato de fluoresceína (LCA-FITC) según el grado de cuerpo polar. | 55 |
| Tabla N° 14 | Resumen de los diferentes patrones de distribución de gránulos corticales (GC) según la morfología del primer cuerpo polar. | 56 |
| Tabla N° 15 | Perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. | 63 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Fig. N° 1 | Esquema de la síntesis de ácidos grasos en el nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> . | 7 |
| Fig. N° 2 | Mecanismo general de integración del transgén al genoma mediado por la transposasa. | 10 |
| Fig. N° 3 | Fotografías de la clasificación de ovarios realizada según morfología. | 14 |
| Fig. N° 4 | Microfotografías de diferentes clases de ovocitos según morfología. | 17 |
| Fig. N° 5 | Microfotografías de las mediciones de espesor de la cobertura de células del cúmulus, espesor de la zona pelúcida, diámetro del ooplasma; área y perímetro del ooplasma. | 18 |
| Fig. N° 6 | Esquema del plásmido pCMV(CAT)T7-SB100X utilizado en los experimentos de transfección. | 25 |
| Fig. N° 7 | Esquema del plásmido pT2-CAGG-FAT2-Neo utilizado en los experimentos de transfección. | 26 |
| Fig. N° 8 | Microfotografías de ovocitos bovinos teñidos con Hoechst donde no se observan alteraciones en la morfología nuclear. Magnificación de 400x. | 45 |
| Fig. N° 9 | Microfotografías de ovocitos bovinos con extrusión del primer cuerpo polar. | 49 |
| Fig. N° 10 | Gráfico de barras representativo del porcentaje de ovocitos bovinos maduros con cuerpo polar según grados morfológicos. | 50 |
| Fig. N° 11 | Porcentaje de ovocitos viables para los diferentes grados de cuerpo polar de ovocitos maduros. | 51 |
| Fig. N° 12 | Microfotografías de ovocitos maduros teñidos con yoduro de propidio. | 52 |
| Fig. N° 13 | Gráfico de barras de la media de fluorescencia celular total corregida (CTCF) según el grado de cuerpo polar de ovocitos maduros. | 53 |
| Fig. N° 14 | Microfotografías en microscopio confocal de ovocitos maduros teñidos con LCA-FITC mediante el protocolo con zona pelúcida. | 56 |
| Fig. N° 15 | Microfotografías en microscopio confocal de ovocitos maduros teñidos con LCA-FITC según el grado de cuerpo polar sin zona pelúcida. | 57 |
| Fig. N° 16 | Microfotografías de colonias monoclonales de MAC-T transfectadas con los plásmidos del sistema <i>Sleeping Beauty</i> . | 60 |
| Fig. N° 17 | Corrida electroforética para visualizar integridad del ADN genómico de las muestras y PCR con cebadores específicos de mFAT-2. | 61 |
| Fig. N° 18 | Cromatogramas donde se observa la aparición de los picos de los diferentes ácidos grasos según el tiempo de retención de cada uno. | 64 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AG | Ácidos grasos |
| AGM | Ácidos grasos monoinsaturados |
| AGP | Ácidos grasos poliinsaturados |
| AGS | Ácidos grasos saturados |
| ALA | Ácido α -linolénico |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ASB | Albumina sérica bovina |
| BCB | Tinción con azul de cresilo brillante |
| BF ₃ _MeOH | Trifluoruro de boro en metanol |
| CaCl ₂ | Cloruro de Calcio |
| CC | Células del cúmulus |
| CeFAT-2 | Desaturasa de <i>C. elegans</i> |
| CL | Cuerpo lúteo |
| ClNa | Cloruro de sodio |
| CMV | Citomegalovirus |
| COCs | Complejos cúmulo-ovocito |
| CP | Cuerpo polar |
| CTCF | Fluorescencia celular total corregida |
| DCF | 2',7'-diclorofluoresceína |
| DMEM | Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| EE | Error estándar |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| FAT | Enzima desaturasa |
| FD | Folículo dominante |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FSH | Hormona folículo estimulante |
| GC | Gránulos corticales |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GI | Gen de interés |
| H ₂ DCFH-DA | Diacetato de 5-6-carboxi 2,7 diclorodihidrofluoresceína |
| His | Histidina |
| ICSI | Inyección intracitoplasmática de espermatozoides |
| ID | Densidad integrada |
| IP | Ioduro de propidio |
| ITRs | Repeticiones terminales invertidas |
| Kb | Kilobases |
| KDa | Kilo Dalton |
| LA | Ácido linoleico |
| LB | Luria Bertani |
| LCA | Aglutinina de <i>lens culinaris</i> |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LH | Hormona luteinizante |



| | |
|-------------|---|
| MAC-T | Línea de células epiteliales bovinas inmortalizadas de tejido mamario |
| MI | Primera metafase |
| MII | Segunda metafase |
| MIV | Maduración <i>in vitro</i> |
| ml | Mililitros |
| MM | Medio de maduración |
| mM | Milimolar |
| MW | Multi-well |
| nm | Nanometros |
| NO | Ausencia de CL y/o FD. |
| Pb | Pares de bases |
| PB | <i>piggyBac</i> |
| PBS | Buffer salino con fosfato de Dulbecco libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEI | Polietilenimina |
| PIV | Producción <i>in vitro</i> de embriones |
| p/v | Peso/volumen |
| R123 | Rodamina 123 |
| SB | <i>Sleeping Beauty</i> |
| SB 100X | Transposasa SB hiperactiva |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TALENs | Transcription activator-like effector nuclease |
| TNCS | Transferencia nuclear de células somáticas |
| TPasa | Transposasa |
| UI | Unidades internacionales |
| v/v | Volúmen/volumen |
| ZFNs | Zinc-finger nucleases |
| ZP | Zona pelúcida |
| ZPB | Birrefringencia de la zona pelúcida |
| $\Delta 12$ | Delta 12 |
| $\Delta 15$ | Delta 15 |
| ω -3 | Omega-3 |
| ω -6 | Omega-6 |

RESUMEN

Los sistemas de producción *in vitro* (PIV) de embriones se utilizan tanto para fines productivos como para generar embriones necesarios para la investigación científica. Sin embargo, la eficiencia de la PIV de embriones en especies ganaderas, medida como la proporción de ovocitos inmaduros que alcanzan el estadio de blastocisto, rara vez supera el 30-40%. En bovinos, una de las principales razones de este bajo porcentaje tiene que ver con la heterogeneidad en la calidad de los ovocitos que provienen de ovarios de animales sacrificados en mataderos. Para mejorar la eficiencia de la PIV resulta necesario identificar variables predictivas del estado funcional de los ovocitos antes de la maduración *in vitro* (MIV), evaluar la capacidad de maduración de estos y las características posteriores a la MIV.

Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo es realizar una caracterización morfológica, cuantitativa y biológica de ovarios y ovocitos provenientes de animales destinados a faena con el fin de establecer métodos sencillos y no invasivos de selección de ovocitos competentes para ser utilizados en tecnologías de reproducción *in vitro*.

Fue posible caracterizar morfológica y biológicamente tanto los ovarios como sus complejos cúmulus-ovocito (COCs) y ovocitos provenientes de un frigorífico local. Alrededor del 90 % resultaron ser ovocitos y COCs de buena calidad para ser utilizados en ensayos de PIV.

Posterior a la MIV, las medidas determinadas de área, perímetro y diámetro del ooplasma, espesor de la zona pelúcida (ZP) y expansión de las células del cúmulus (CC) fueron significativamente superiores a las determinadas previo a la MIV.

También se evaluó la incidencia de la morfología del primer cuerpo polar (CP) en parámetros como viabilidad, producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y distribución de gránulos corticales (GC). Los resultados mostraron que la morfología del primer CP está relacionada con las variables indicativas de calidad mencionadas y, por lo tanto, pudo concluirse que la morfología del primer cuerpo polar es un método relativamente sencillo y no invasivo que permite identificar ovocitos bovinos maduros de calidad, supuestamente con mayor probabilidad de promover el desarrollo embrionario.

Finalmente, se desarrolló un sistema transgénico en células bovinas en cultivo, basado en el transposón *Sleeping Beauty*, para mediar la integración genómica de secuencias que codifican la desaturasa mFAT2. Los vertebrados son incapaces de sintetizar ácidos grasos

(AG) poliinsaturados. Contrariamente, el nematodo *C. elegans* puede sintetizarlos ya que cuenta con las desaturasas necesarias para dicho proceso. En este trabajo, se logró transfectar con éxito células bovinas MAC-T con el gen de la desaturasa mencionada, mediante el sistema transposón *Sleeping Beauty*. Las líneas celulares bovinas transgénicas que expresaron establemente la enzima mFAT2 mostraron un perfil lipídico con presencia de AG poliinsaturados.

Sobre la base de todos estos resultados se espera lograr en un futuro una mejor eficiencia en las tecnologías de reproducción *in vitro* en especies ganaderas mediante una selección cuidadosa de ovocitos previo a la MIV y luego de la MIV identificar los de mejor calidad de acuerdo a la morfología del primer CP. Sumado a esto, a partir del sistema transgénico desarrollado podrían obtenerse animales portadores del gen de la desaturasa para producir leche con un mejor perfil lipídico para el consumo humano.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) has been utilized for both productive and scientific purposes. However, the efficiency of IVP in livestock species, as measured by the proportion of immature oocytes reaching the blastocyst stage, rarely exceeds 30-40%. In cattle, one of the main reasons for this low percentage is due to the heterogeneous oocytes quality, especially considering that the ovaries used in most cases come from slaughterhouses. To enhance the efficiency of IVP, it is crucial to identify predictive variables of the maturation capacity and functional state of oocytes before *in vitro* maturation (IVM).

Based on this precedent, a morphological, quantitative and biological characterization of ovaries and oocytes was carried out from slaughtered animals. The main objective was to establish simple and non-invasive methods for selecting competent oocytes to be used in breeding technologies in *in vitro* reproduction.

It was possible to characterize morphologically and biologically the ovaries and their COCs and oocytes from the local slaughterhouse. Around 90% turned out to be oocytes and COCs of good quality to be used in IVP trials. After IVM, the measurements determined for area, perimeter and diameter of the ooplasm, thickness of the zona pellucida (ZP) and expansion of cumulus cells (CC) were significantly higher than those determined before IVM. The influence of the first polar body (PB) morphology was also evaluated in parameters such as viability, production of reactive oxygen species (ROS) and distribution of cortical granules (CG). The results showed that the first PB morphology is related to the aforementioned indicative quality variables. Therefore, it could be concluded that the first PB morphology is a relatively simple and non-invasive method that would allow selecting quality mature bovine oocytes with a greater probability of promoting embryonic development.

Finally, a transgenic system was developed in cultured bovine cells, based on the Sleeping Beauty transposon, to mediate the genomic integration of sequences that encode the mFAT2 desaturase. Vertebrates are incapable of synthesizing polyunsaturated fatty acids (PUFA). On the contrary, the nematode *C. elegans* can synthesize them since it has the necessary desaturases for this process. In this work, bovine MAC-T cells were successfully transfected with the aforementioned desaturase gene, using the Sleeping Beauty transposon system. Transgenic bovine cell lines that stably expressed the mFAT2 enzyme showed a lipid profile with the presence of PUFAs.

Based on all these results, it is expected to achieve better efficiency in in vitro reproduction technologies in livestock species in the future through careful selection of oocytes prior to their IVM and subsequently according to the morphology of the first PB. In addition to this, from the transgenic system developed, animals carrying the desaturase gene could be obtained to produce improved milk for human consumption.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción *in vitro* de embriones y caracterización morfológica de ovarios y ovocitos.

Los sistemas de producción *in vitro* de embriones (PIV) se han utilizado tanto para fines productivos como para producir embriones necesarios para la investigación científica, incluidos los programas para generar animales clonados mediante transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), animales transgénicos, células madre embrionarias, entre otros (Nagano, 2018a). La eficiencia de la PIV de embriones en especies ganaderas, medida como la proporción de ovocitos inmaduros que alcanzan el estadio de blastocisto, rara vez supera el 30-40 %, lo que significa que la proporción de ovocitos que no se desarrollan después de la maduración, la fertilización y el cultivo *in vitro* es considerablemente grande (Aguila y col., 2020). En bovinos, una de las posibles razones de las bajas tasas de desarrollo de ovocitos madurados *in vitro* puede ser la degeneración. La vaca es mono-ovuladora, por lo que la mayoría de los ovocitos utilizados para la PIV están destinados a degenerar (Nagano y col., 2006). A su vez, la calidad de los ovocitos es muy variable ya que en la mayoría de los casos provienen de ovarios de animales sacrificados en mataderos y las características de su origen (por ejemplo, identidad o mérito genético de la donante, etapa del ciclo estral, etapa de la onda folicular) es a menudo desconocida (Lonergan y Fair, 2016). Por lo tanto, normalmente se obtiene una población heterogénea de ovocitos que tiene una capacidad variada para madurar y soportar el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización, lo que se conoce como competencia de desarrollo o calidad del ovocito (Aguila y col., 2020).

De esta manera, para mejorar la eficiencia de PIV, es necesario evaluar la capacidad de maduración y el estado funcional de los ovocitos antes de la maduración *in vitro* (MIV) (Nagano, 2018) y realizar una selección precisa de ovocitos competentes para la producción de embriones *in vitro*, teniendo en cuenta que la calidad intrínseca del ovocito es uno de los principales factores que afectan el desarrollo embrionario temprano. Algunos de los criterios de valoración empleados con fines académicos para la selección de ovocitos o embriones son el número de blastómeras, proporción de células apoptóticas, estudios genéticos y epigenéticos. Todas estas son técnicas que no permiten la continuidad del proceso de desarrollo embrionario ya que son invasivas o de naturaleza terminal (*end point*). También se han estudiado procedimientos más sofisticados tales como qRT-PCR, análisis transcriptómico global y proteómico. Sin embargo, la falta de un método lo suficientemente

rápido que produzca resultados confiables dificulta la implementación de estas tecnologías (Aguila y col., 2020).

En referencia con los fines productivos, es necesario utilizar métodos no invasivos para valorar la competencia ovocitaria, como la evaluación morfológica (Timlin y col., 2021). Es ampliamente aceptado que los ovocitos con ooplasma marrón o pardo y homogéneo, rodeados por unacobertura compacta y múltiples capas de células del cúmulo, son adecuados para la MIV (Leibfried y First, 1979). La **Tabla N° 1**, adaptada de la revisión de Aguila y col. (2020), resume algunas características asociadas con la competencia ovocitaria.

Tabla N° 1. Resumen de indicadores morfológicos y visuales de competencia ovocitaria (Modificada de Aguila y col., 2020).

| Criterios | Recomendación |
|---|--|
| Morfología ovárica | Presencia de estructuras relacionadas con el ciclo estral. |
| Morfología de los complejos cúmulo-ovocito (COC) | COCs con al menos cinco capas de células del cúmulo (CC), cúmulo compacto y/o ligeramente expandido, con o sin manchas oscuras en el ovocito. |
| Contenido de lípidos | El ooplasma oscuro indica alta competencia, el de color claro indica falta de lípidos y poca competencia, y el ooplasma negro indica envejecimiento. |
| Expansión del cúmulo y tamaño del ovocito | No asociado a la calidad del ovocito; papel importante en la fecundación. |
| Tamaño del ovocito | Diámetros >115 y <130 micras. |
| Morfología del primer cuerpo polar | Cuerpo polar de forma redonda, homogénea, con una superficie lisa o intacta. |
| Birrefringencia de la zona pelúcida (ZPB) | Una ZP con baja refringencia está relacionada con ovocitos de alta calidad y un mejor desarrollo embrionario. |

| | |
|--|---|
| Birrefringencia del huso meiótico y de la zona pelúcida | Herramienta útil para procedimientos de micromanipulación (inyección intracitoplasmática de espermatozoides ICSI) o TNCS. También para la evaluación de la integridad posterior al descongelado de ovocitos bovinos vitrificados. |
| Tinción con azul de cresilo brillante (BCB) | Los ovocitos BCB+ tienen mayor competencia de desarrollo que los ovocitos BCB-. |

Si bien es útil la evaluación morfológica, es intrínsecamente subjetiva y el resultado varía según la experiencia de cada técnico, por lo cual resulta interesante sumar a estos criterios cualitativos, otros de naturaleza cuantitativa para reducir las discrepancias entre laboratorios (Timlin y col., 2021). Algunas de estas determinaciones se basan en las mediciones de parámetros físicos que pueden realizarse de manera simple y rápida mediante microscopía, como la medición del diámetro o del área del ooplasma (Hyttel y col., 1997; Otoi y col., 1997) y el diámetro de la zona pelúcida (ZP) (Balakier y col., 2012; Timlin y col., 2021).

1.2. Morfología del primer cuerpo polar.

Las características morfológicas que se asocian con la calidad ovocitaria posterior a la maduración *in vitro* incluyen: expansión de las células del cumulus, presencia del primer cuerpo polar (CP) y ausencia de anomalías en citoplasma y ZP (Hu y col., 2014). Sin embargo, estas características son insuficientes para garantizar una correcta MIV. La competencia de los ovocitos depende de los eventos de maduración nuclear y citoplasmática (los cuales deben ocurrir de manera simultánea) como así también de factores ambientales y maternos. La maduración nuclear incluye la ruptura de la vesícula germinal de la meiosis I, la formación de la placa de la primera metafase (MI) y la primera división meiótica con extrusión del primer cuerpo polar y la formación de la placa de la segunda metafase (MII). Por otro lado, la maduración citoplasmática se caracteriza por el posicionamiento de los gránulos corticales (GC) debajo de la membrana citoplasmática y la reestructuración de otros

orgánulos y estructuras. Estos eventos son cruciales para garantizar la competencia del ovocito para ser fecundado (Pavani y col., 2020) y su posterior desarrollo embrionario. En la especie bovina, la extrusión del primer CP comienza entre las 16 y 18 horas después iniciada la MIV. No obstante, la maduración citoplasmática en el ganado bovino se completa varias horas después de la maduración nuclear, probablemente entre 24 y 30 horas posteriores al comienzo de la MIV (Aguila y col., 2020).

En humanos se investigó la asociación entre la competencia de los ovocitos y la morfología del primer CP. Según Ebner y col. (1999), la transferencia de embriones seleccionados sobre la base de la morfología del primer CP resultó en tasas más altas de implantación y embarazo. Rose y Laky (2013) encontraron que los cuerpos polares con morfología fragmentada se asocian con problemas de fertilización y desarrollo embrionario en ovocitos de esta misma especie. Otro grupo de investigación (Younis y col., 2009) demostró que la morfología del primer CP tiene el potencial de predecir la competencia de los ovocitos y la capacidad de alcanzar el embarazo a término en mujeres infértiles que se someten a un tratamiento con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En un estudio realizado en porcinos, se relacionó la morfología del primer cuerpo polar con parámetros como la distribución de gránulos corticales en el ooplasma, el clivaje, el desarrollo embrionario y el nivel de acetilación del material genético de los embriones (Hu y col., 2014). Los resultados de este estudio, indican que la selección de los ovocitos según la morfología del primer cuerpo polar permite identificar ovocitos más competentes y por ende mejorar el desarrollo embrionario *in vitro*. Hasta la actualidad no existen estudios que analicen la morfología del primer CP en bovinos y su influencia en la competencia de maduración, fertilización y desarrollo embrionario (Aguila y col., 2020).

Cabe destacar que resulta necesario una mayor investigación y análisis de los ovocitos con alto potencial de desarrollo para la aplicación de nuevas tecnologías. Por ejemplo, se requiere una mejor selección de ovocitos para la producción de líneas estables de células madre pluripotentes bovinas, que se utilizarán posteriormente en ciencia básica, genética, epigenética, *gene imprinting*, y para la producción de modelos animales con aplicaciones en producción animal, entre otros (Goszczynski y col., 2019).

1.3. Biotecnología Transgénica - Mejoramiento genético del desempeño productivo en vacas lecheras: papel de la desaturasa FAT-2.

La tecnología transgénica se refiere a la capacidad de modificar deliberadamente el genoma de un organismo mediante la incorporación de ADN exógeno o la sustitución-remoción de secuencias endógenas. Esta, se convirtió en una herramienta con aplicaciones importantes en el área de la salud humana y la salud y producción animal. Las técnicas de transgénesis fueron inicialmente desarrolladas en roedores para la generación de animales genéticamente modificados en el campo de la investigación básica. Si bien éste continúa siendo un modelo muy útil para la ingeniería genética (Chung y col., 2016; Mantegazza y col., 2016), existen otras especies en las cuales la manipulación de sus genomas abriría nuevas oportunidades. Actualmente, el impulso generador de nuevas tecnologías reside en los potenciales usos de la transgénesis de grandes animales en ganadería y biomedicina. Dentro de las posibilidades que ofrece la plataforma tecnológica de animales transgénicos se pueden mencionar la producción de biomoléculas destinadas al tratamiento de gran cantidad de enfermedades (McWhir, 2002; Peng y col., 2015; Bertolini y col., 2016), producción de órganos para xenotransplante (Kues y Niemann, 2004), el desarrollo de modelos animales para diversas enfermedades humanas (Norgren, 2004; Rogers, 2016), entre otras.

La manipulación del genoma bovino representa una herramienta potencial para la generación de hembras bovinas capaces de producir leche nutricionalmente más apropiada para el consumo humano. De hecho, existen antecedentes que demuestran que es posible modificar la composición de la leche en animales transgénicos para mejorar su calidad y, por ejemplo, reducir su potencial alergénico en humanos (Sabikhi, 2007).

Se ha demostrado que es posible aumentar la proporción de ácidos grasos (AG) Omega-3 (ω -3) en la leche de ratones y bovinos (Kao y col., 2006; Wu y col., 2012). Estos ácidos grasos poliinsaturados, junto con los ácidos grasos Omega-6 (ω -6), son nutrientes imprescindibles para el desarrollo cerebral y cognitivo del humano. Se ha reportado que la ingesta de AG ω -3 reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Lemaitre y col., 2003; Calder, 2004; Marik y Varon, 2009), desórdenes neurológicos (Hibbeln, 1998) y cáncer (Roynette y col., 2004). En conjunto, estos AG se han descrito como hipolipemiantes, reductores de los niveles de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad de sus siglas en inglés), y tienen acción reductora de la agregación plaquetaria (Guivemau y col., 1994). Debido a que la especie humana carece de las enzimas desaturasas necesarias para sintetizarlos, los AG ω -3 y ω -6 son considerados esenciales y deben ser incorporados de manera exógena. La dosis diaria recomendada de estos ácidos grasos no es normalmente alcanzada en la dieta típica en los países en desarrollo (**Tabla N° 2**), de lo que se deduce que aumentar la ingesta de estos

lípidos a través de los alimentos redundaría en una mejor calidad de vida.

Tabla N° 2. Aportes de ácidos grasos por consumo de leche de vaca y su dosis diaria recomendada.

| | Por 100 g de porción comestible | Recomendación diaria-hombre | Recomendación diaria-mujer |
|----------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| Lípidos totales (g) | 3,600 | 100-117 | 77-89 |
| AGS (g) | 1,950 | 23-27 | 18-20 |
| AGM (g) | 0,930 | 67 | 51 |
| AGP (g) | 0,090 | 17 | 13 |
| Omega-3 (g) | 0,016 | 3,3-6,6 | 2,6-5,1 |
| Omega-6 (g) | 0,068 | 10 | 8 |

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. Adaptado de Moreiras y col., 2013.

Esto es particularmente relevante para habitantes de regiones mediterráneas a quienes se les dificulta incluir en la dieta carne de pescado, la cual es considerada una de las principales fuentes de ω -3 y ω -6.

Se han realizado grandes esfuerzos para modificar el perfil de los ácidos grasos en la leche de vaca, pero existen muchas barreras que impiden que los ácidos grasos poliinsaturados ingeridos con la dieta del bovino formen parte de la leche, como los procesos de biohidrogenación y esterificación en el rumen (Lanier y Corl, 2015), y la baja especificidad de las lipoproteínas de la glándula mamaria por estos tipos de ácidos grasos (Stamey Lanier y col., 2013).

Experimentalmente, también se ha logrado manipular la dieta del ganado para obtener una proporción de AG ω -6/ ω -3 más adecuada a los requerimientos humanos (Butler, 2014), pero la implementación real en la práctica ganadera comercial es técnicamente complicado y sumamente costoso.

Debido a los impedimentos fisiológicos para el enriquecimiento de la leche con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, y a la baja aplicabilidad de agregarlos al alimento de los animales, la manipulación del genoma bovino representaría una herramienta para lograr un aumento de la cantidad de estos lípidos esenciales en la leche para consumo.

Las desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ han sido identificadas en una variedad de organismos incluyendo eucariotas inferiores, plantas y animales, excepto mamíferos. Los vertebrados poseen la enzima esteroil-(CoA)-desaturasa, la cual sintetiza AG monoinsaturados a partir de los AG saturados. Sin embargo, al no contar con las enzimas requeridas para la síntesis de ácido linoleico ($18:2n-6$, un importante AG $\omega-6$ precursor de otros AG $\omega-6$) ni del AG $\omega-3$ ácido α -linolénico (ALA, $18:3n-3$), dependen de las fuentes dietarias para cubrir los requerimientos (Blanco, 2011). Por el contrario, el nematodo *Caenorhabditis elegans* es capaz de sintetizar ambos AG insaturados (Zhou y col., 2011). Se ha reportado que la enzima FAT-2 de este nematodo (CeFAT-2) es capaz de catalizar desaturaciones $\Delta 15$ además de la clásica desaturación $\Delta 12$ de AG de 16 y 18 átomos de carbono (Zhou y col., 2011). Esto resulta en la producción tanto de LA (ácido linoleico) como de ALA a partir del ácido oleico ($C18:1n9$), utilizando solo una enzima (**Figura N°1**).

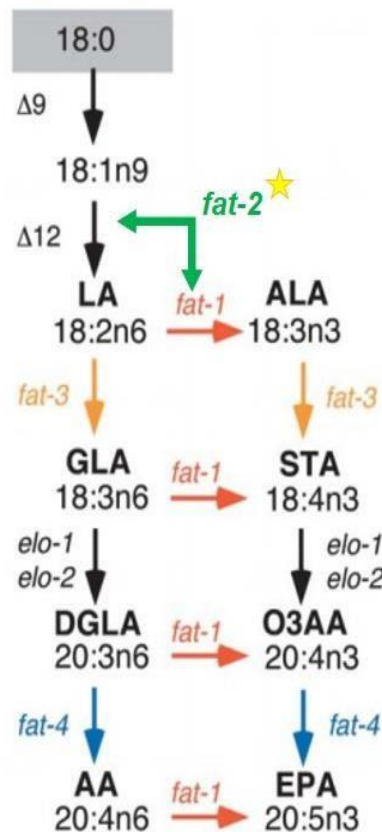


Figura N° 1. Esquema simplificado de la síntesis de ácidos grasos (AG) en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, donde se puede observar que la acción de las enzimas FAT-2 ($\Delta 12$, en verde) y FAT-1 ($\Delta 15$, en rojo) permiten la síntesis de una amplia gama de AG omega 3 ($\omega-3$) y AG omega 6 ($\omega-6$), entre ellos el ácido linoleico (LA) y el ácido α -linolénico (ALA). Adaptada de Kahn-Kirby y col., 2004.

La actividad de esta molécula representa una gran ventaja a la hora de realizar transgénesis, dado que la regulación y el control de la expresión de una sola enzima puede ser mucho más preciso y posibilita la incorporación posterior de otras desaturasas, como la FAT-3 o la FAT-4, que permitirían obtener leche con un espectro más amplio de AG insaturados, aumentando aún más el valor nutricional de la leche bovina modificada.

Desde la identificación de los genes responsables de la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, se ha logrado clonar e introducir desaturasas en un amplio número de especies. Inicialmente, se emplearon las secuencias provenientes de *C.elegans* para expresar desaturasas en *Saccharomyces cerevisiae* (Peyou-Ndi y col., 2000) y en ratones transgénicos, donde se observó un incremento en la proporción de ácidos grasos ω -3 y ω -6 en tejidos y órganos (Zhang y col., 2013). Al mismo tiempo, se reportó la generación de cerdos transgénicos, empleando una desaturasa proveniente de plantas (Saeki y col., 2004). Posteriormente, se emplearon secuencias optimizadas para mamíferos, tanto en cerdos (Lai y col., 2006) como en rumiantes (Wu y col., 2012; Peng y col., 2015).

1.4. Transgénesis activa mediada por elementos transponibles.

La transgénesis activa involucra aquellos métodos en los cuales la integración del transgén al genoma huésped es facilitado por la acción de enzimas asociadas tales como recombinasas (Cre, flipasa) (Garrels y col., 2011), transposasas (*piggyBac*, *Sleeping Beauty*, Tol2) (Carlson y col., 2011; Alessio y col., 2016), integrasas virales (lentivirus) (Hofmann y col., 2006) o endonucleasas (ZFNs - siglas en inglés de *zinc-finger nucleases*, TALENs - siglas en inglés de *Transcription activator-like effector nuclease*) (Yu y col., 2011). Éste término fue acuñado para remarcar las diferencias con la transgénesis pasiva, donde la incorporación del ADN exógeno se lleva a cabo en sitios donde se producen al azar rupturas espontáneas en la doble hebra de ADN, que son reparadas posteriormente por mecanismos endógenos del genoma huésped (Shinohara y col., 2007).

La transgénesis activa mediada por elementos transponibles, se planteó como una metodología alternativa y eficiente con respecto a otras, como el uso de vectores retrovirales. Los transposones o elementos transponibles constituyen elementos genéticos móviles que fueron originalmente descritos en el maíz (McClintock, 1950) y luego en una gran variedad de organismos, desde insectos hasta humanos. En estos últimos y en roedores, los elementos

representan más del 45% del genoma, sugiriendo su importancia en el proceso evolutivo. La mayoría están inactivos debido a una acumulación de mutaciones deletéreas a lo largo del tiempo (Bosch y col., 2015).

La característica distintiva de los transposones es su capacidad para movilizarse de un lado a otro del genoma a través de un fenómeno conocido como transposición.

Durante la transposición, una copia simple de la secuencia de interés, flanqueada por secuencias cortas llamadas repeticiones terminales invertidas ITRs (del inglés *Inverted Terminal Repeats*) es integrada dentro del genoma a través de un mecanismo preciso catalizado por una enzima asociada, la transposasa. Debido a que la integración del transgén es facilitada por la acción de una enzima, el proceso se conoce como transgénesis activa y se asocia a una expresión a largo plazo del gen de interés en las células (Garrels y col., 2011). Los transposones que han sido más extensamente estudiados y utilizados en transgénesis animal son *piggyBac* (PB) y *Sleeping Beauty* (SB) (**Figura N°2**).

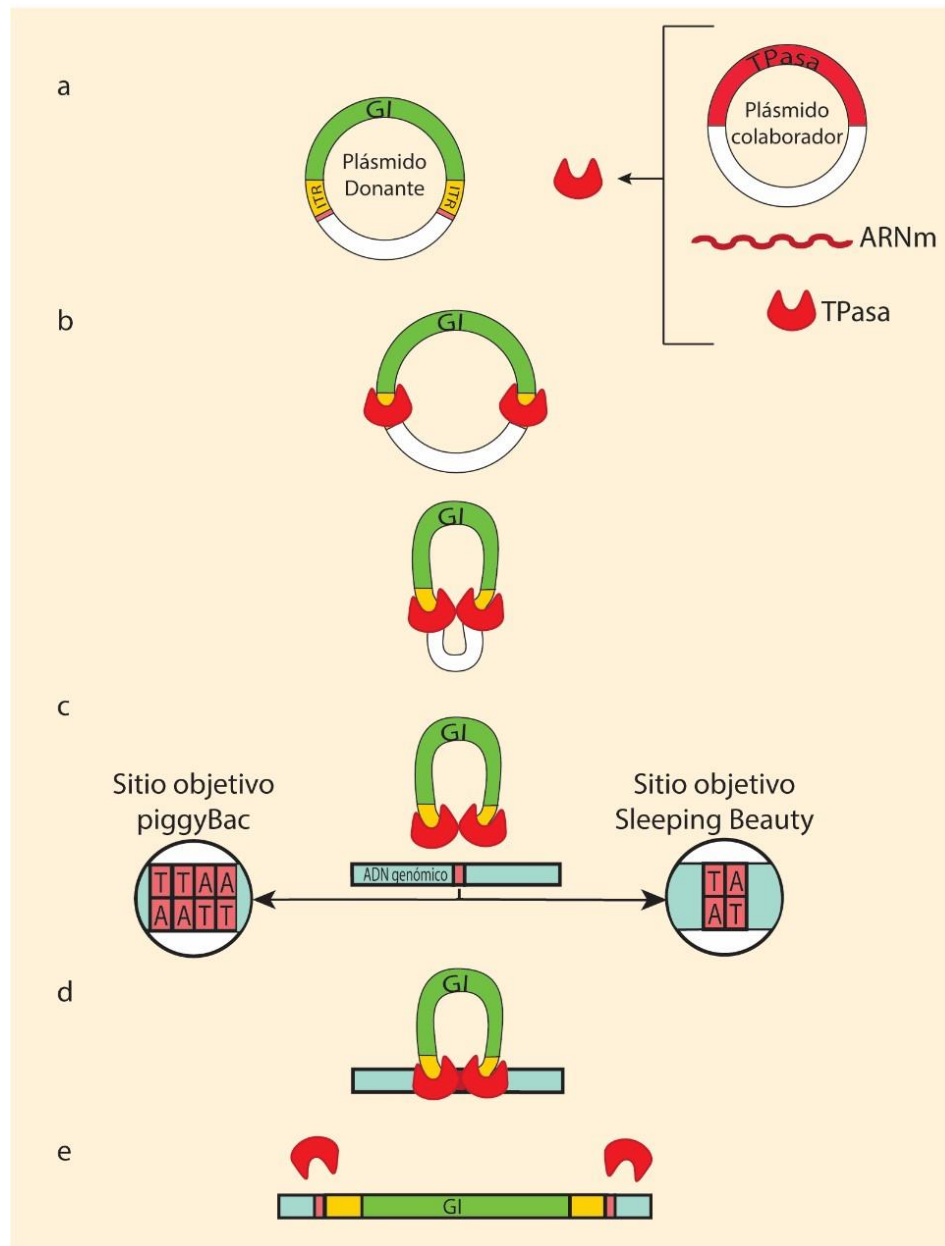


Figura N° 2. Mecanismo general de integración del transgén al genoma mediado por la transposasa. La transposasa (TPasa) es comúnmente sintetizada a partir de un vector de expresión (plásmido colaborador), ARNm o provista como proteína. El gen de interés (GI) flanqueado por los ITRs (repeticiones terminales invertidas) es transportado en un vector independiente (plásmido donante) (a). La transposasa reconoce y se une a los ITRs catalizando rupturas en la doble hebra del ADN en sus extremos (b). El complejo transposón-transposasa se une a un sitio específico en el genoma (c) y se lleva a cabo la integración del transposón flanqueado por los ITRs (d-e). Esquema tomado de Bosch y col., 2015.

1.5. *Transposón Sleeping Beauty.*

Sleeping Beauty es un transposón que se encontraba inactivo y fue recuperado mediante la eliminación de una mutación que inactivaba a la transposasa, a partir de una secuencia consenso obtenida desde el genoma de diferentes especies de salmones (Ivics y col., 1997).

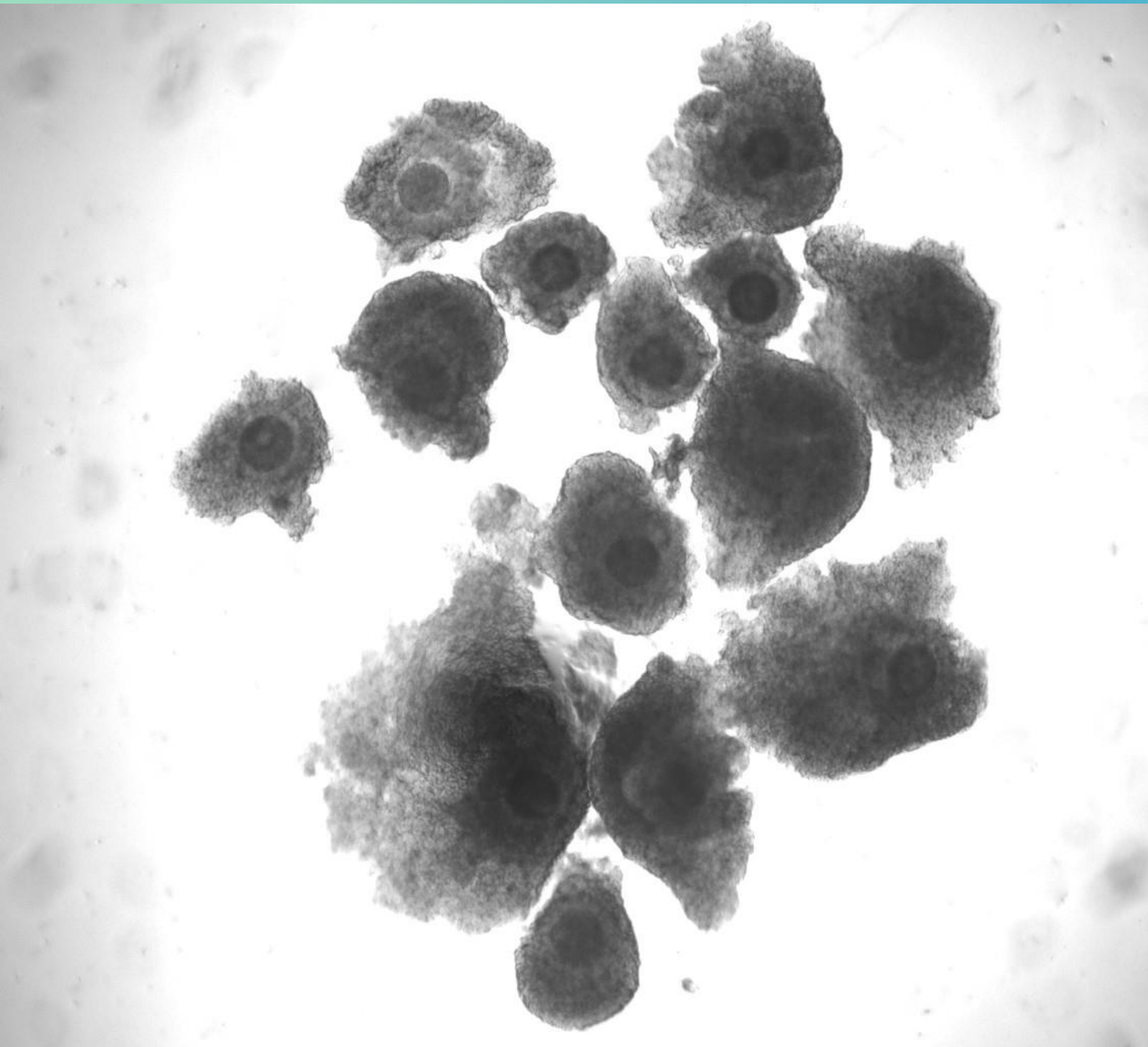
Está compuesto por una secuencia de ADN de 1,6 kilobases (kb), flanqueada por terminales repetidas de 250 pares de bases (pb). Ésta codifica una única proteína, la Transposasa SB, la cual cataliza la movilización del transposón SB de un locus genómico a otro.

Se sabe que el transposón SB tiende a insertarse dentro de regiones ricas en TA y la secuencia “ANNTANNT” es el motivo preferido para la integración de SB (Carlson y col., 2003). Aunque SB puede transponerse a casi cualquier ubicación dentro del genoma, su capacidad de carga puede alcanzar un máximo de solo 13 kb, y su eficiencia se ve disminuida de manera inversamente proporcional con el aumento del tamaño del inserto (Zayed y col., 2004).

El sistema SB ha sido adaptado por el hombre para poder utilizarlo como herramienta transgénica. En este caso, la secuencia de la transposasa es reemplazada por el gen de interés, quedando flanqueado por los ITRs, mientras que la transposasa se expresa a partir de otro plásmido. El SB sintético fue el primer transposón utilizado para introducir modificaciones en el genoma de vertebrados, incluyendo peces, roedores y humanos (Dupuy y col., 2005; Huang y col., 2006; Sinzelle y col., 2006). También, se ha demostrado que este sistema es activo tanto en células somáticas como en células germinales de ratón (Yant y col., 2000; Carlson y col., 2003).

De acuerdo a los antecedentes presentados previamente sobre diferentes estrategias para mejorar la eficiencia de la PIV de embriones y de la transgénesis animal, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS.

La caracterización no invasiva de ovarios y ovocitos bovinos que provienen de animales faenados permite la identificación y selección de ovocitos con mayores chances de desarrollo. Ovocitos madurados *in vitro* presentan cuerpos polares con diferentes morfologías. A su vez la misma está asociada a parámetros biológicos de calidad ovocitaria, como viabilidad y producción de especies reactivas del oxígeno, y es indicativa de maduración nuclear y citoplasmática. Los ovocitos seleccionados pueden ser utilizados para generar animales transgénicos a través de TNCS. Mediante el uso del transposón *Sleeping Beauty*, es posible incorporar de manera estable el gen que codifica la enzima heteróloga mFAT2 al genoma de células bovinas en cultivo. La expresión de la desaturasa mFAT2 genera un cambio en el perfil lipídico de las células bovinas, donde se observa la presencia de ácidos grasos poliinsaturados.

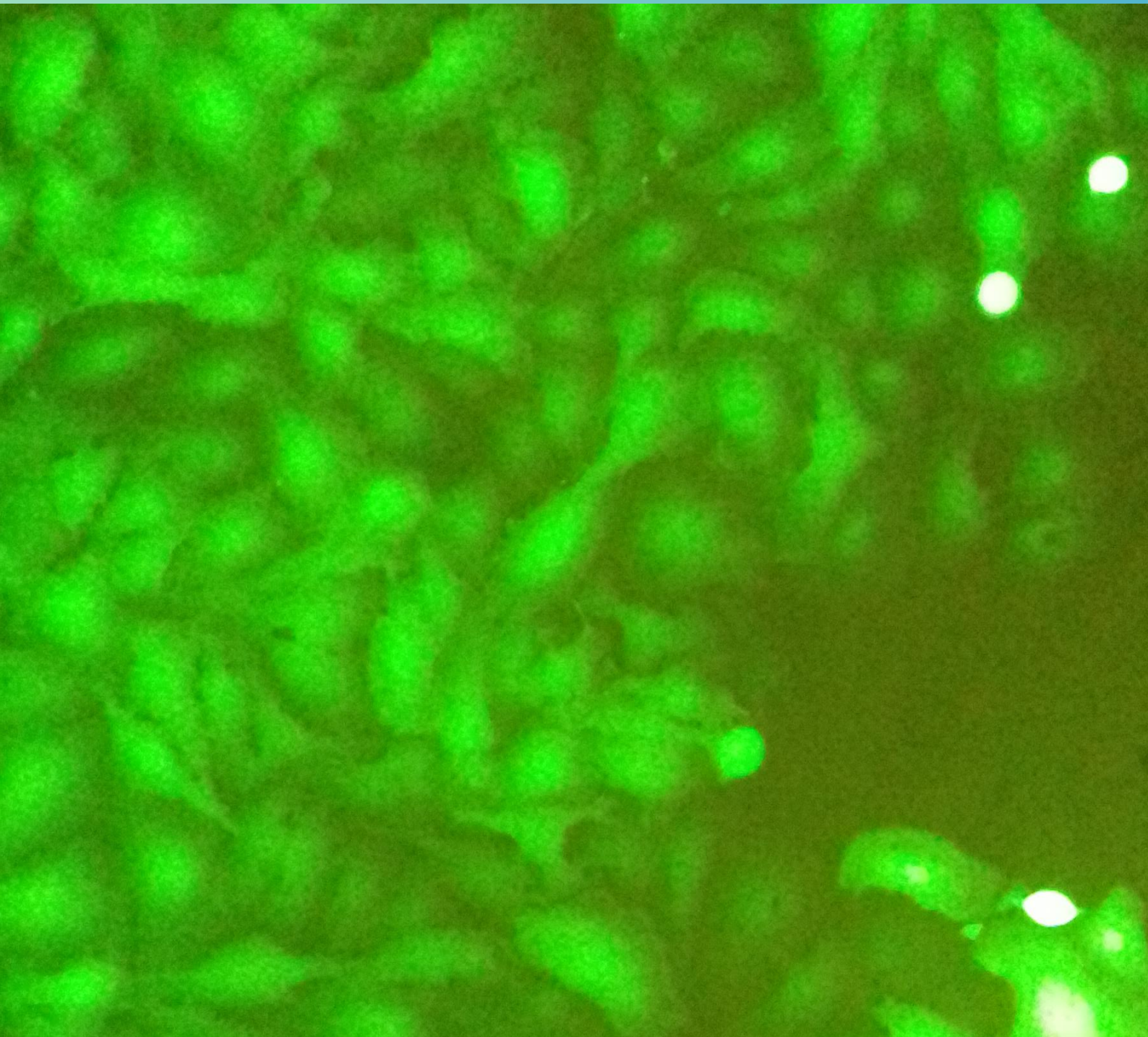
3. OBJETIVO GENERAL

Establecer métodos sencillos y no invasivos de selección de ovocitos competentes para ser utilizados en tecnologías de reproducción *in vitro* y métodos transgénicos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar ovarios y ovocitos bovinos según parámetros morfológicos y biológicos no invasivos.
- 2- Clasificar morfológicamente diferentes tipos de cuerpos polares luego de realizar la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.
- 3- Estudiar la posible relación entre la morfología del primer cuerpo polar en ovocitos madurados *in vitro* con diferentes parámetros biológicos indicativos de calidad ovocitaria.
- 4- Analizar la asociación entre los eventos de maduración nuclear y citoplasmática según la morfología del primer cuerpo polar y los gránulos corticales, eventos indicativos de una maduración completa.
- 5- Desarrollar un sistema transgénico en células bovinas en cultivo, basado en el transposón *Sleeping Beauty* (SB), para mediar la integración genómica de secuencias que codifican una enzima heteróloga (mFAT2).

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. *Obtención de ovarios.*

Los ovarios utilizados proceden de animales destinados a faena, los cuales son recolectados por un operario de la planta del Frigorífico Coronel Moldes (Río Cuarto) y mantenidos en un contenedor térmico a temperatura ambiente hasta ser procesados. El procesamiento se realiza en un laboratorio de la Universidad Nacional de Río Cuarto, ubicada a 10 km del frigorífico, y el tiempo que transcurre entre la recolección y la aspiración folicular no supera las 5 horas. Posteriormente, los ovarios son lavados con solución de CNa al 0.9 % atemperada a 38 °C.

4.2. *Clasificación morfológica de ovarios.*

Los ovarios se clasificaron morfológicamente sobre la base de la presencia o ausencia de estructuras del ciclo estral como: CL (cuerpo lúteo) los que poseían cuerpo lúteo, FD (folículo dominante) los que presentaban folículo dominante, CL-FD los que tenían ambas estructuras, y en los que estas estaban ausentes, NO (Varisanga y col., 1998; Manjunatha y col., 2007; Karami Shabankareh y col., 2015). En la **Figura N° 3** pueden observarse fotografías de la clasificación realizada.

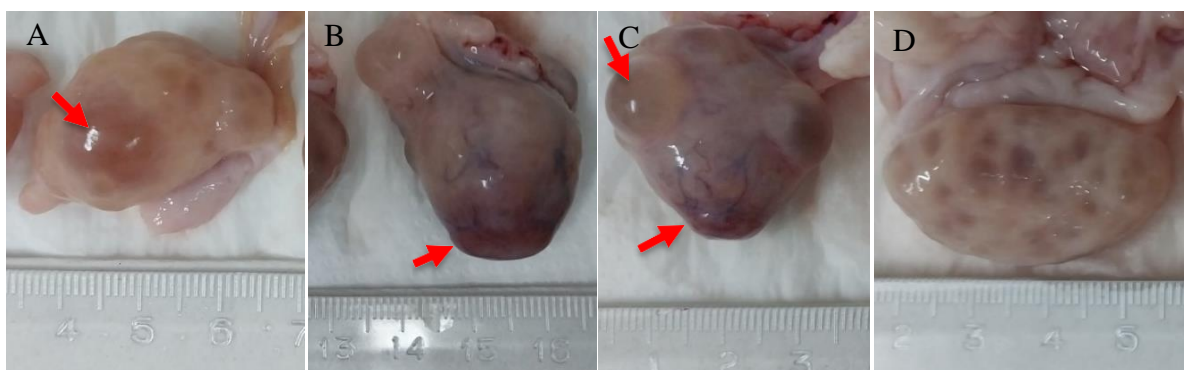


Figura N° 3. Fotografías de la clasificación de ovarios realizada según morfología. Las flechas rojas indican las diferentes estructuras del ciclo estral. **A)** FD (folículo dominante); **B)** CL (cuerpo lúteo); **C)** CL-FD (presencia de ambas estructuras); **D)** NO (ausencia de FD y/o CL).

Por otro lado, de cada ovario se contabilizó separadamente la cantidad de folículos que

presentaron un diámetro en el rango de 0 a 3 mm, los que medían de 3 a 8 mm y los que poseían más de 8 mm. Estas categorías fueron creadas en base a estudios realizados por diferentes autores, los cuales emplearon diferentes categorías entre sí. Hyttel y col. (1997) utilizó la clasificación de folículos antrales pequeños (3-5 mm) y medianos (6-10 mm). Pavlok y col. (1992) agruparon los COCs como pequeños los menores de 2 mm, medianos los que presentaron entre 2 y 4 mm, y grandes los folículos de 4 a 8 mm de diámetro.

En el protocolo de Hansen Laboratory (2017) se clasificaron los ovarios provenientes de frigoríficos como buenos cuando presentan gran cantidad de folículos pequeños y medianos, evitando utilizar los folículos con más de 10 mm de diámetro.

En nuestro caso particular, creamos nuevas categorías que abarquen las clasificaciones previamente mencionadas.

4.3. Recolección de complejos cúmulus-ovocitos (COCs).

Los COCs se obtuvieron mediante el método de aspiración con jeringa. Para ello se utilizó una aguja 18 G acoplada a una jeringa de 10 ml. La punción de los folículos se realizó dirigiendo la aguja desde el interior del parénquima ovárico y aspirando varios folículos sin sacar la aguja; evitando recolectar sangre durante el proceso. Se punzaron los folículos visibles en la superficie ovárica de diferentes tamaños según requerimientos del ensayo. El líquido folicular obtenido, entre 50 a 100 ml por ensayo, fue colectado en tubos cónicos de 50 ml protegidos de la luz con papel aluminio y atemperados a 37-38 °C. La muestra se dejó decantar por 10 minutos y posteriormente se aspiró el fondo de cada tubo para tomar los COCs que decantaron. El líquido folicular restante fue centrifugado y utilizado para la búsqueda de COCs en una lupa estereoscópica.

4.4. Caracterización de COCs.

La búsqueda y recolección de todos los COCs aspirados anteriormente se realizó en placas reticuladas conteniendo el líquido folicular centrifugado como medio de búsqueda, a través de una lupa estereoscópica. Se lavaron dos veces en el líquido folicular centrifugado y se visualizaron en un microscopio invertido Eclipse E-300 (Nikon, Tokio, Japón) para tomar las fotografías (cámara Nikon acoplada) necesarias para analizar posteriormente diferentes características.

Cada COCs registrado mediante microfotografías se caracterizó visualmente por una misma

persona según:

4.4.1. Cobertura:

Presentaban **cobertura total** los ovocitos completamente rodeados por las células del cumulus (CC); **parcial** los que presentaban discontinuidad en el revestimiento del ovocito por las capas de CC; y **desnudo** los que no poseían CC a su alrededor (**Figura N° 4 A**).

4.4.2. Capas de células del cúmulus (CC):

Tal como se mencionó previamente, la selección de COCs para utilizarlos en tecnologías reproductivas se basan en criterios cualitativos. Uno de ellos es la evaluación cualitativa de las capas de CC. Dentro de la población de COCs analizada, se designaron como “**3**” a los COCs que más capas presentaban, “**2**” los que tenían una cantidad intermedia de capas, y “**1**” para los que tenían solamente 1 o 2 capas de CC (**Figura N° 4 A**).

4.4.3. Compactación de las células del cúmulus (CC):

Se clasificaron como **compactas** las CC que estaban estrechamente asociadas entre sí; **ligeramente relajadas** las CC que, si bien estaban estrechamente asociadas entre sí, en algunas zonas comenzaban a notarse CC más relajadas; y **relajadas** las CC que parecían estar levemente asociadas y se mantenían unidas por una matriz "pegajosa" (**Figura N° 4 A**).

4.4.4. Ooplasma:

Se catalogaron como **homogéneos** los ovocitos que presentaban granulaciones distribuidas homogéneamente en su citoplasma, y **no homogéneos** los ovocitos con granulaciones aglomeradas formando puntos negros, vacuolas o citoplasma retraído (**Figuras N° 4 B y C**).

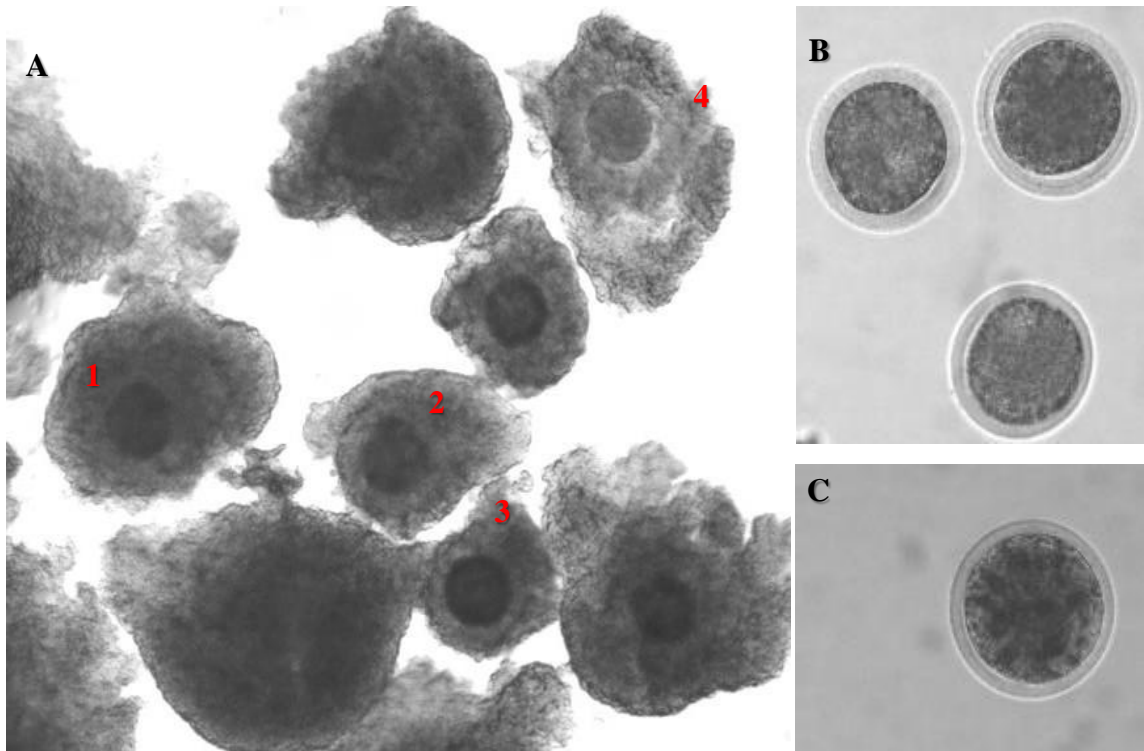


Figura N° 4. Microfotografías de diferentes clases de ovocitos según su morfología. **A)** Ejemplos de complejos cúmulus-ovocitos (COCs) caracterizados como **1-** completamente rodeado por células del cúmulus (CC), las cuales se observan compactas y con la máxima clasificación de capas de CC; **2-** Complejo cúmulus-ovocito (COC) con cobertura total, CC compactas y con una cantidad intermedia de capas de CC; **3-** COC con cobertura total y la mínima cantidad de CC; **4-** COC con cobertura total, pero con las capas de las CC ligeramente expandidas. **B)** Ovocitos con ooplasma homogéneo; **C)** ovocito con ooplasma no homogéneo, con gránulos negros.

También se analizaron las imágenes de microscopía por medio del software Fiji (Schindelin y col., 2012) con una escala basada en la imagen de una cuadrícula de hemocitómetro tomada con el mismo aumento. Las mediciones realizadas fueron las siguientes:

4.4.5. Espesor de la cobertura de las Células del Cúmulus (CC):

Se midió el espesor de las capas de CC de cada COC desde la refringencia de la zona pelúcida (ZP) del ovocito hasta la última capa de CC que rodeaba completamente al ovocito (**Figura N° 5 A**).

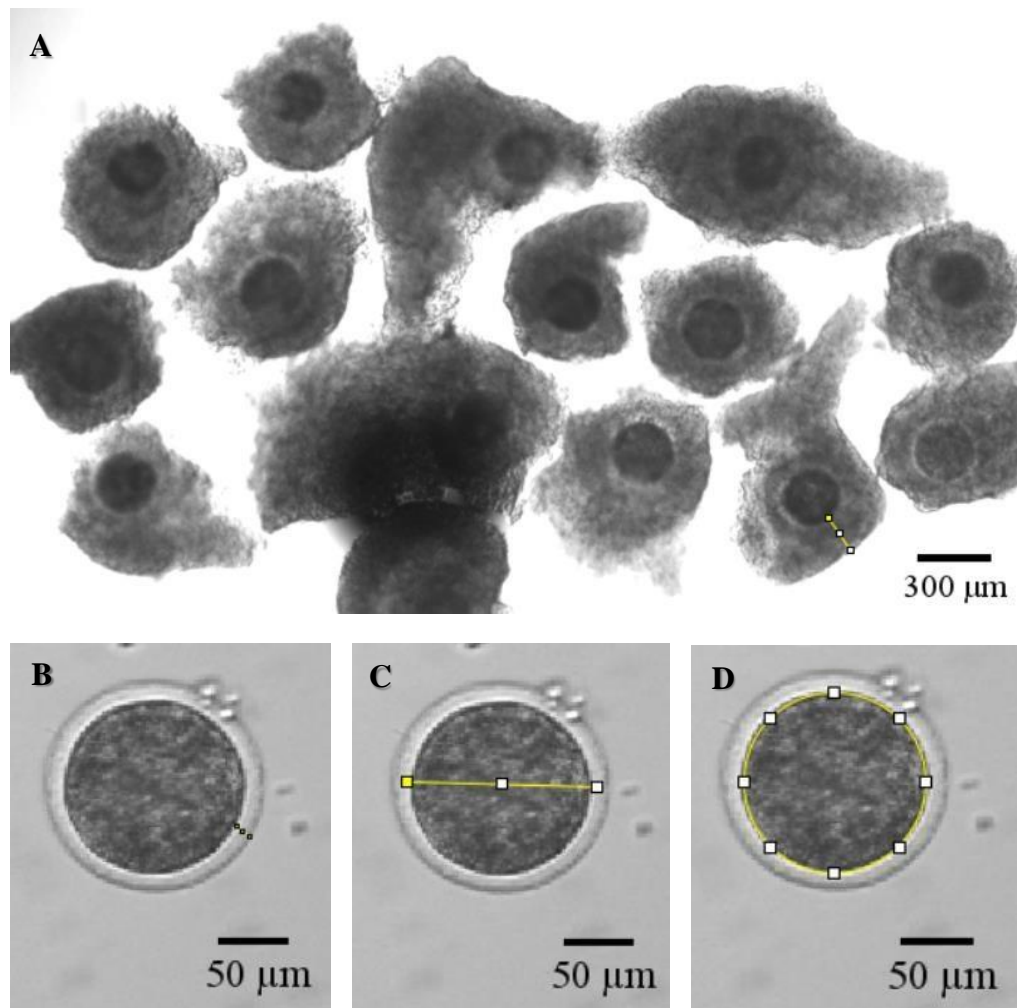


Figura N° 5. Microfotografías de las mediciones realizadas, mediante el programa Fiji, de **A)** espesor de la cobertura de ovocito por las células del cúmulus; **B)** espesor de la zona pelúcida; **C)** diámetro del ooplasma; **D)** área y perímetro del ooplasma.

4.4.6. Área, perímetro y diámetro del ooplasma:

Previo a tomar las fotografías de los ovocitos para realizar las mediciones, se procedió a denudar los COCs. Para ello, se realizaon tres lavados de los COCs con PBS atemperado para quitarles restos de medio que puedan inactivar la enzima a utilizar. Se los coloca en PBS con enzima hialuronidasa Sigma H3884-50MG (0.5 mg/ml) en vórtex durante 5 minutos. Luego, se recolectan los ovocitos denudos y se los vuelve a lavar en PBS para renovar los restos de CC y hialuronidasa. Estos ovocitos son fotografiados y a partir de esas imágenes se procedió a medirles tanto diámetro (**Figura N° 5 C**) como área y perímetro (**Figura N° 5 D**), sin incluir la ZP.

4.4.7. Diámetro de la zona pelúcida (ZP):

Al igual que la determinación anterior, en ovocitos desnudos se midió el grosor de la ZP (**Figura N° 5 B**).

4.5. Caracterización biológica de ovocitos bovinos.

Además, se analizaron diferentes pruebas biológicas de los ovocitos recolectados, donde posterior a cada tinción, se tomaron microfotografías para ser analizadas según presencia/ausencia o nivel de intensidad de fluorescencia. Las pruebas realizadas fueron:

4.5.1. Integridad del ADN mediante tinción con Hoechst 33342:

El Hoechst 33342 (2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1h-benzimidazol trihidrocloruro trihidrato) es un colorante que penetra en las células y se une específicamente al ADN. Luego de denudar los ovocitos, se los colocó en una solución de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se visualizaron en microscopio de epifluorescencia (rango de filtro: excitación 360 ± 40 nm y emisión de fluorescencia 460 ± 50 nm).

4.5.2. Ensayo de Viabilidad mediante tinción con Ioduro de propidio (IP):

El IP (Sigma-Aldrich) es un colorante que se une al ADN bicatenario, pero se excluye de células con la membrana plasmática intacta, es decir que es impermeable a la membrana celular. Al igual que en la tinción con Hoechst 33342, los ovocitos desnudos fueron incubados con IP a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (excitación: 568 nm, emisión: 580-660 nm).

4.5.3. Potencial de membrana mitocondrial mediante tinción con Rodamina 123:

El potencial de membrana mitocondrial es un indicador de la actividad mitocondrial y desempeña un papel importante en la producción de ATP, el equilibrio redox, la señalización y el metabolismo. Nuevamente, el protocolo de tinción es el mencionado previamente, utilizando una concentración final de Rodamina 123 de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (excitación: 488 nm, emisión: 515-575 nm) y analizadas con el programa Fiji para medir la intensidad de fluorescencia de cada ovocito. Posteriormente, se calculó para cada uno la fluorescencia

celular total corregida (CTCF) como se explica en el Anexo 2.

4.6. Cálculo de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) mediante el programa Image J-Fiji.

A partir de fotografías de los ovocitos de interés teñidos, se selecciona la zona a determinar la fluorescencia. Previamente se configuran los parámetros a medir: área seleccionada de la célula, media de la fluorescencia del *background*, y la densidad integrada (ID). Para obtener la fluorescencia del *background*, se seleccionan tres zonas alrededor de la célula de interés y se hace un promedio de la fluorescencia obtenida. Con la siguiente fórmula se obtiene la fluorescencia corregida.

$$\text{CTCF} = \text{ID} - (\text{área celular seleccionada} \times \text{media de fluorescencia del } \textit{background})$$

4.7. Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

Para la maduración *in vitro* se colectaron COCs de buena calidad, siendo aquellos con un citoplasma homogéneo de color gris o marrón uniformemente oscuro y rodeados por un cúmulus compacto (Hansen Laboratory, 2017). El medio de maduración (MM) utilizado fue Medium 199 (Sigma, M2520), conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), 7,5 U/ml de hormona folículoestimulante (FSH) (Folitime, Folitropina Alfa recombinante humana, 300 UI/0,5 ml), 0,3 mM de piruvato de sodio (Sigma, P2256), 0,1 mg/ml de L- glutamina (Sigma, G8540-25G) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma, G1264). Los ovocitos fueron incubados entre 22 y 24 horas en gotas de 80 µl de medio, cubiertas por aceite mineral (Sigma, M8410), a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y máxima humedad.

4.8. Clasificación del primer cuerpo polar de ovocitos madurados *in vitro* según su morfología.

Pasado el tiempo de incubación en MM, se procedió a denudar los COCs con enzima hialuronidasa (0,5 mg/ml) como se explicó previamente. Luego, estos ovocitos se transfirieron a una solución de paraformaldehído al 3,7 % por al menos 30 minutos y se visualizaron en microscopio óptico invertido para observar y clasificar los cuerpos polares según su morfología. El criterio de clasificación fue el siguiente: cuerpo polar con superficie

fragmentada (**grado A**), superficie lisa o intacta (**grado B**), y superficie rugosa (**grado C**) (Hu y col., 2014).

4.9. Tinción inmunocitoquímica de gránulos corticales para determinar la intensidad de fluorescencia de ovocitos bovinos maduros.

Posteriormente a la MIV, se siguió el protocolo modificado de Hu y col. (2014), donde luego de remover las células del cúmulus, los ovocitos maduros se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 30 minutos y se enjuagaron con PBS tres veces. Seguidamente, los ovocitos se permeabilizaron en una solución de Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos y se enjuagaron cuatro veces con PBS. Luego, se incubaron en la solución de tinción de PBS con 5 µg/ml de aglutinina *lens culinaris* conjugado con isotiocianato de fluoresceína (AGGLUTININ-LCA/FITC, InvitrogenL32475) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los ovocitos se enjuagaron con PBS y se montaron en portaobjetos para ser visualizados con un microscopio invertido de fluorescencia (excitación y emisión de 488 y 515 nm, respectivamente).

Según el grado de cuerpo polar, se tomaron fotografías de los ovocitos teñidos para evaluar con posterioridad la intensidad de fluorescencia de cada uno mediante el software Fiji (Schindelin y col., 2012). Se calculó para cada uno la fluorescencia celular total corregida (CTCF) utilizando la metodología explicada previamente en la sección materiales y métodos y Anexo 2.

4.10. Tinción inmunocitoquímica de gránulos corticales para determinar la disposición de los mismos en ovocitos bovinos maduros.

Pasado el tiempo de la maduración *in vitro*, los ovocitos fueron desnudados y agrupados según la morfología del primer cuerpo polar en diferentes tubos conteniendo PBS. Estas estructuras fueron visualizadas mediante microscopio óptico invertido, manteniendo constantemente la temperatura de 38 °C. Luego, se continuó con el procedimiento de tinción según el método de Hosoe y Shioya (1997). Los ovocitos desnudados se sumergieron en solución de PBS que contenía 0,5 % (p/v) de pronasa (Sigma) para disolver la zona pelúcida, durante 5 minutos; dicho paso favorece la difusión del colorante hacia el citoplasma de los ovocitos. Estos se lavaron en PBS y se fijaron en una solución de PBS que contenía paraformaldehído al 3,7 % (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron tres veces en una solución de bloqueo compuesta por 3 mg de albúmina sérica bovina (ABS-Sigma A3294), 7,51 mg de glicina (Bio Basic Inc.) y 1 ml de PBS. Se sumergieron en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% (v/v) (Biopack) durante 5 minutos a 20 °C y luego se lavaron dos veces en la solución de bloqueo mencionada. Los ovocitos se sumergieron en una solución de tinción compuesta por 10 µg/ml de LCA (aglutinina *lens culinaris* conjugado con isotiocianato de fluoresceína LCA/FITC, Invitrogen L32475), 0,1 µl de Triton X-100, 3 mg de ABS y 1 ml de PBS, durante 30 minutos a 20 °C. Los ovocitos teñidos se lavaron minuciosamente en PBS que contenía Triton X-100 al 0,01 % (v/v) y ABS al 0,3 % (p/v). Finalmente, los ovocitos se mantuvieron en PBS hasta ser visualizados mediante microscopía confocal (Microscopio óptico confocal Olympus FV 1200) a una longitud de onda 515 nm.

Los patrones de distribución de los GC en el citoplasma de los ovocitos se clasificaron de la siguiente manera (Hu y col., 2014):

- Tipo 1:** GC distribuidos en el citoplasma del ovocito, pero no en membrana plasmática.
- Tipo 2:** GC distribuidos en la corteza y formando un halo fluorescente alrededor de la membrana plasmática.
- Tipo 3:** GC distribuidos parcialmente en la membrana plasmática y en el citoplasma.

4.11. Ensayo de Viabilidad de ovocitos maduros mediante tinción con Ioduro de propidio (IP).

Se evaluó la viabilidad de los ovocitos maduros según cada grado de cuerpo polar empleando la metodología de tinción mencionada previamente. Se consideraron ovocitos viables los que no presentaron fluorescencia en el ooplasma.

4.12. Niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) de ovocitos maduros mediante tinción con diacetato de 5-6-carboxi 2,7 diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFH-DA).

El H₂DCFDA es una forma de fluoresceína reducida químicamente que se utiliza como indicador de especies reactivas de oxígeno en las células. Tras la disociación de los grupos diacetato por parte de las esterasas intracelulares y la oxidación, el H₂DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente.

La producción de ERO se evaluó para cada grado de cuerpo polar en ovocitos madurados *in vitro*. Después del tiempo de cultivo en MM, los ovocitos se desnudaron y se incubaron en una solución de H₂DCFH-DA 10 μ M (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, EE. UU.) en PBS, durante 30 minutos a una temperatura de 38,5 °C, según protocolo modificado en ovocitos porcinos (Zhang y col., 2020). Los ovocitos teñidos se montaron entre porta y cubreobjetos. La conversión de H₂DCFH a DCF por la presencia de ERO se visualizó en microscopio de fluorescencia (excitación y emisión de 484 y 535 nm, respectivamente), y se registraron fotografías para evaluar posteriormente la CTCF de cada ovocito como se mencionó previamente.

Se incluyó al ensayo la menadiona como control positivo de altos niveles de producción de ERO. La menadiona es una naftoquinona (2-metil-1,4-naftoquinona) capaz de generar ERO y causar apoptosis (Moss y col., 2009). Este compuesto reacciona con un electrón para producir un derivado de radicales libres causando la formación de aniones superóxido. Se cultivaron ovocitos en MM con una concentración de 5 μ M de menadiona, a 38,5 °C por 22-24 horas (Moss y col., 2009; Cavallari y col., 2019).

4.13. Análisis estadístico.

Cada determinación se realizó por triplicado (exceptuando los ensayos de producción de ERO, que se realizaron por duplicado). Los datos se analizaron utilizando el programa InfoStat (Di Renzo y col., 2018), por medio de medidas estadísticas resumen, análisis de la varianza y test de bondad de ajuste (Test de Bonferroni).

4.14. *Tranfección de células bovinas en cultivo mediante el sistema transposón Sleeping Beauty para mediar la integración genómica de secuencias que codifican una enzima heteróloga (mFAT-2).*

4.14.1. Condiciones de cultivo de MAC-T.

MAC-T es una línea de células epiteliales bovinas inmortalizadas de tejido mamario (Huynh, Robitaille y Turner, 1991). Estas células fueron cultivadas en medio de mantenimiento DMEM suplementado con 10 % de SFB, 2mM glutamina (Glutamax 100X), 5 μ g/mL insulina (Novorapid aspártica, Flex Pen, 100 U/mL), hidrocortisona 1 μ g/mL (Fridalit, 1

mg/mL), en estufa de cultivo a 38°C, con atmósfera controlada de 5 % CO₂ y alta humedad. Las células se repicaron por digestión química con tripsina al 0,05 % durante 5 minutos a 37 °C en estufa y fueron sembradas en frascos de 75 cc conteniendo el medio de cultivo mencionado.

4.14.2. Congelado y descongelado de las células bovinas.

Las células se cultivaron en frascos de 75 mL de capacidad hasta que alcanzaron el 90 % de confluencia, se digirieron químicamente con tripsina al 0,05 % durante 5 minutos a 37 °C y centrifugaron por 5 minutos en tubos de 15 ml. El *pellet* celular fue seguidamente resuspendido en medio de congelación (DMEM + 20 % v/v SFB; 10 % v/v DMSO) y transferido a tubos crioviales de 2 mL. Los crioviales se colocaron en un recipiente comercial para congelación de células, el cual trabaja en baño de alcohol isopropílico (*Mister Frosty*). El recipiente con los crioviales se colocó en un freezer -80 °C durante al menos un día. Este sistema garantiza una tasa de enfriamiento de 1°C/minuto, lo que se traduce en una mayor viabilidad y recuperación de las células post-descongelado. Pasado este tiempo, se colocaron los crioviales en un termo de nitrógeno líquido. Las líneas se congelaron a una densidad de 1 millón de células/mL de medio de congelación.

Para descongelarlas, los crioviales se transfirieron desde el termo de nitrógeno líquido a un baño de agua a 37 °C hasta su descongelación. Posteriormente, la suspensión de células se colocó en un tubo de centrífuga de 15 mL conteniendo 5 mL medio DMEM al 10 % v/v de SFB y se centrifugaron 5 minutos a 94 g a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células del *pellet* en 1 mL de medio, se transfirieron a placas o frascos de cultivo y se mantuvieron en estufa a 38,5 °C, 5 % CO₂ en aire y máxima humedad.

4.14.3. Vectores Plasmídicos:

pCMV(CAT)T7-SB100X: El primero de los plásmidos correspondientes al sistema transposón *Sleeping Beauty* posee las secuencias que codifican para la transposasa SB hiperactiva; ésta es una proteína modificada a través de ingeniería genética, que le permite tener una actividad 100 veces aumentada con respecto a la original y se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV). A su vez, contiene todas las características necesarias para su correcta replicación y amplificación en la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 α , con resistencia al antibiótico cloranfenicol (**Figura N° 6**).

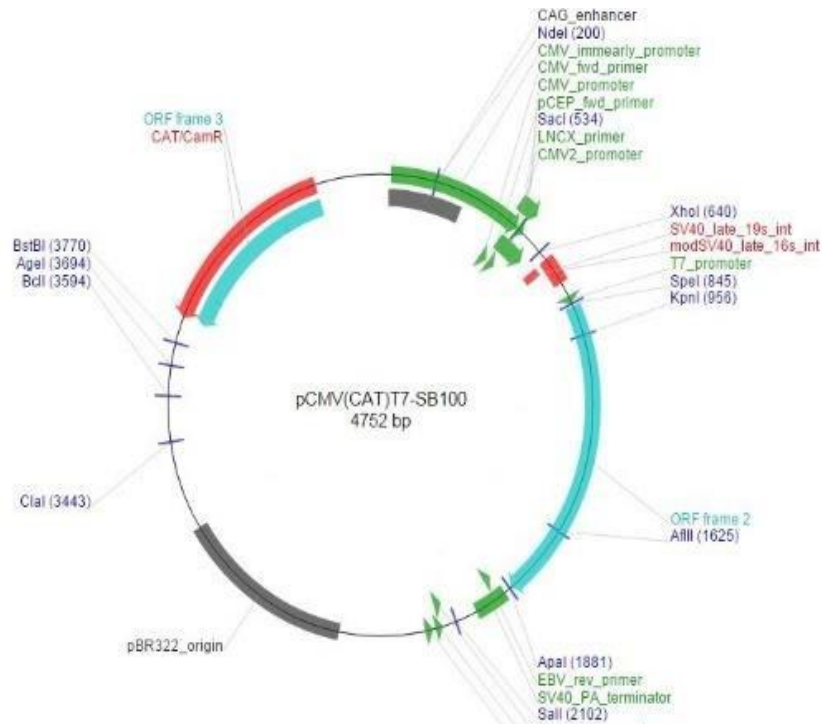


Figura N° 6. Esquema del plásmido **pCMV(CAT)T7-SB100X** utilizado en los experimentos de transfección.

pT2-CAGG-FAT2-Neo: el segundo de los plásmidos correspondiente al sistema transposón SB, contiene un casete de expresión de la enzima desaturasa mFAT2, bajo la regulación del promotor constitutivo CAGG, y flanqueado por las secuencias de reconocimiento para la enzima transposasa SB (ITRs). Este vector presenta la particularidad de tener fusionado un tag de histidina (His), el cual se utilizará para cuantificar y purificar la desaturasa. Este plásmido posee también los sitios necesarios para la amplificación y replicación en la cepa *E. coli* DH5 α , con resistencia al antibiótico ampicilina (**Figura N° 7**).

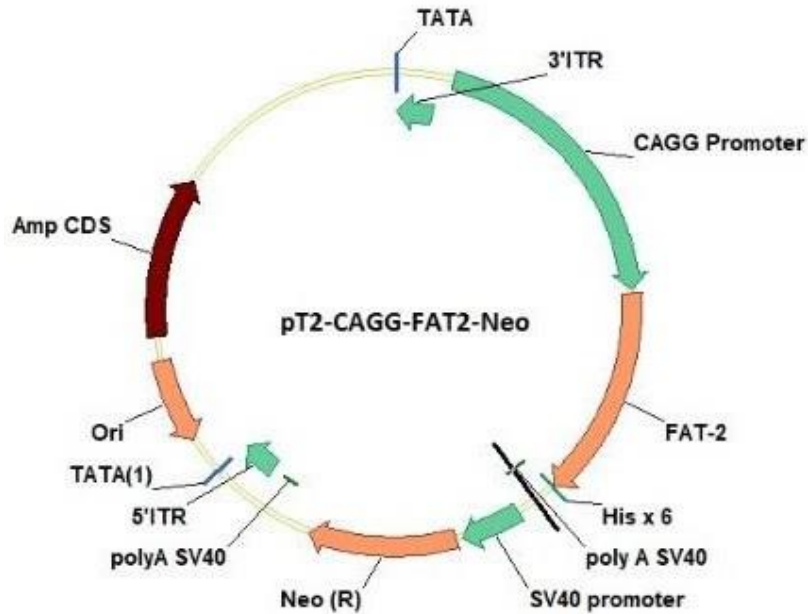


Figura N° 7. Esquema del plásmido **pT2-CAGG-FAT2-Neo** utilizado en los experimentos de transfección.

Cabe destacar que éste plásmido contiene una secuencia de mFAT-2 que fue adaptada para la expresión en células de mamíferos. Dado que la predilección de codones difiere entre nematodos (*C. elegans*) y mamíferos, el grupo de investigación envió a sintetizar, en la Compañía GenSript, un ADN que contiene tripletes que se corresponden con los más utilizados por células de mamíferos. Previamente, ADNc de la enzima CeFAT-2 fue obtenido mediante PCR a partir del plásmido PXZP278, gentilmente cedido por el Dr. Zhou (CSIRO, Black Mountain Laboratories, Canberra, Australia). De esta manera, los niveles de expresión de la proteína CeFAT-2 deberían ser mayores con esta versión optimizada. Este ADN codificante, es el que fue subclonado en el plásmido mencionado anteriormente, y llamamos mFAT-2 a la proteína que expresa.

pT2/RMCE/Venus: por último, este vector posee un casete de expresión de la proteína Venus; ésta proteína verde fluorescente, derivada de la GFP, posee modificaciones genéticas que le confieren mayor actividad y menor citotoxicidad. Además, la expresión se encuentra bajo el control del promotor constitutivo CAGG, que tiene gran actividad en células de mamíferos. Por otro lado, el gen de la proteína Venus se encuentra flanqueado por las secuencias de reconocimiento para la enzima transposasa SB (ITRs). El esqueleto del plásmido contiene los componentes que permiten que el plásmido pueda ser propagado en la

cepa *E. coli* DH5 α , con resistencia al antibiótico ampicilina.

4.14.4. Cepa Bacteriana.

Con el fin de clonar los plásmidos previamente descritos, se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α (Δ lac U169- ϕ 80 lac Z Δ M15-, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1). Esta posee las características que se describen a continuación:

- La mutación endA1: inactiva una endonucleasa intracelular que degrada ADN plasmídicos.
- recA mutado: elimina la recombinación homóloga; lo que reduce la formación de deleciones y la multimerización de plásmidos.
- Δ (lacZ)M15: mutación que permite la traducción de la subunidad amino terminal del gen LacZ, lo que permite utilizarlo como gen de selección positiva mediante α -complementación. Estas mutaciones facilitan el proceso de incorporación de ADN exógeno y su posterior amplificación para ser empleado en la metodología del ADN recombinante.

4.14.5. Obtención de plásmidos.

Debido a que las bacterias utilizadas son incapaces de incorporar ADN exógeno de manera natural, se indujo un aumento en la permeabilidad de la membrana celular mediante la utilización de agentes químicos. Para hacer bacterias *E. coli* DH5 α competentes químicamente (capaces de incorporar ADN heterólogo), se utilizó un cultivo crecido toda la noche en medio Luria Bertani (LB) líquido, en agitación y a 37 °C, al cual se lo sometió a la acción de una solución de CaCl₂ 50 mM. Para ello, el cultivo bacteriano se centrifugó a 847 g durante 7 minutos a 4°C. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el *pellet* en 1 mL de la solución de CaCl₂ fría (4-8 °C). Se transfirió la suspensión a tubos eppendorf pre-enfriados y se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 588 g. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de la solución de CaCl₂. Las células se mantuvieron en hielo 30 minutos, se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 588 g, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 200 μ L de la solución de CaCl₂.

Para la transformación de las bacterias con el plásmido de interés, se colocaron 100 μ L de células competentes en un tubo tipo eppendorf estéril con 5 μ L de plásmido almacenado en buffer TE pH=8. Posteriormente, se transfirieron a un baño termostático a 42°C durante 2 minutos para producir un “shock térmico”, con el fin de alterar la permeabilidad de la membrana y permitir el ingreso del ADN exógeno. Luego, se agregó 1 mL de medio LB suplementado con glucosa 20 mM y se cultivaron a 37°C, durante 1 hora en agitación. Para

seleccionar las bacterias transformantes, se sembró la mezcla de transformación en placas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina (200 µg/mL) o cloranfenicol (170 µg/mL) según corresponda, permitiéndoles sobrevivir sólo a aquellos que hayan incorporado el plásmido de interés (gen marcador). Como control de viabilidad, se sembraron en placas LB sin antibiótico células competentes sin transformar; del mismo modo, para realizar el control negativo se sembraron en medio LB suplementado con ampicilina o cloranfenicol. Las placas se llevaron a estufa a 37°C por 16 horas.

4.14.6. Purificación de ADN plasmídico, almacenado y cuantificación.

-Miniextracciones de ADN plasmídico a través de Kit Comercial: se utilizó el kit comercial GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este procedimiento se utiliza una columna de purificación de sílice, la cual permite una mayor purificación del plásmido respecto de métodos caseros. El kit comercial también incluye ARNasa para degradar el ARN contaminante.

-Maxiextracciones de ADN plasmídico a través de kit comercial: de la misma manera, las bacterias transformadas fueron cultivadas en medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37° C. Éstas se centrifugaron a máxima velocidad durante un minuto y posteriormente se siguieron las especificaciones del kit comercial ZymoPURE® maxi prep kit (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.).

-Almacenado de ADN plasmídico: posteriormente a corroborar la calidad del ADN purificado por corrida electroforética en geles de agarosa, los plásmidos purificados por las diferentes técnicas mencionadas anteriormente se almacenaron en freezer a -20 °C para su posterior uso.

-Estimación de la concentración: la determinación de la concentración de ADN plasmídico se realizó por espectrofotometría mediante Nanodrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo). Para ello, se utilizó como blanco la misma solución donde fueron resuspendidos los plásmidos. Se sabe que los ácidos nucleicos absorben luz UV a una longitud de onda de 260 nm. Por otra parte, las proteínas presentan máxima absorbancia de luz UV a 280 nm. Por lo tanto, se determinó el grado de pureza o la ausencia de proteínas y otros contaminantes relacionando las absorbancias a 260 nm y 280 nm (260/280). Un índice mayor a 1,8 indica que el ADN se encuentra en óptimo estado de pureza, sin contaminación de proteínas.

4.14.7. Curva de selección de antibiótico G418.

Descripción de G418 (Sigma-Aldrich 50 mg/mL): es un antibiótico aminoglucósido de estructura similar a la gentamicina que se usa para la selección y el mantenimiento de las células procariotas y eucariotas. Las concentraciones óptimas para la selección y el mantenimiento varían según las líneas celulares. Con respecto al modo de acción, este antibiótico bloquea la síntesis de polipéptidos y el alargamiento de proteínas al inhibir la síntesis en los ribosomas 70S y 80S. G418 selecciona células transfectadas de manera estable con un gen de resistencia a la neomicina.

El objetivo del experimento fue conocer la concentración exacta a la cual este antibiótico inhibe el crecimiento de la línea celular MAC-T. Esta concentración fue la utilizada para seleccionar las células transfectadas de las que no lograron insertar el transposón con resistencia a antibiótico. Para esto, se sembraron las células en placas de 96 pocillos, a una densidad de 1.000 células en cada uno de ellos. Se dejaron en sus condiciones óptimas de cultivo por 24 horas y posteriormente fueron expuestas a diferentes concentraciones de antibiótico durante 20 días, cambiando el medio de cultivo con antibiótico cada 3 días.

4.14.8. Protocolo de transfección.

El día previo a la transfección, se sembraron células MAC-T en placas multi-pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo, para cada tratamiento, en medio DMEM suplementado como se menciona previamente. Se las dejó en cultivo durante 24 horas en estufa, en sus condiciones óptimas. Esta densidad celular de siembra fue probada previamente para obtener a las 24 horas de incubación una confluencia del 80-90 %, porcentaje óptimo para transfectar.

Como agentes de transfección se utilizaron el agente químico comercial polietilenimina (PEI) ramificada de 25 kDa (25 kDa de PEI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), y las nanopartículas lineales de PEI de 87 y 217 kDa sintetizadas por nuestro grupo de laboratorio (Forcato y col., 2017). Los tres agentes mostraron la misma eficiencia de transfección, por lo cual fue indistinta la elección del PEI utilizado.

Sobre la base de trabajos previos en nuestro laboratorio, se toman como relaciones de trabajo para realizar las transfecciones una parte de ADN en dos partes de PEI (1:2). De la misma manera, se empleó una relación transposon/transposasa 1:2. Es decir que se colocaron una parte del plásmido **pT2-CAGG-FAT2-Neo** (que codifica para la expresión de FAT) y/o

pT2/RMCE/Venus (codifica para la expresión de venus, como control de transfección) en dos partes del plásmido **pCMV(CAT)T7-SB100X** (contiene la transposasa SB) optimizada por nuestro grupo (Alessio y col., 2016). En la **Tabla N° 3** se muestran en detalle las cantidades utilizadas en cada experimento de transfección.

Cada mezcla de reacción se preparó en tubos *ependorf* con 100 μL de medio de cultivo, con las siguientes proporciones de plásmidos y PEI:

Tabla N° 3. Diseño de experimentos de transfección.

| | pCMV(CAT)T7-SB100X | pT2/RMCE/Venus | pT2-CAGG-FAT2-Neo | PEI |
|-----------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------|
| CN | - | - | - | - |
| CT | 0,66 μg | 0,33 μg | - | 2 μL |
| 1X | 0,5 μg | 0,25 μg | 0,25 μg | 2 μL |
| 2X | 1 μg | 0,5 μg | 0,5 μg | 4 μL |

CN (control negativo): células sin transfectar. **CT** (control de transfección): en este pocillo se transfecta el gen reportero de la proteína verde fluorescente Venus por medio de la transposasa del sistema. Permite evidenciar que esta enzima está funcionando correctamente. **1X**: tratamiento de co-transfección del plásmido que contiene la enzima mFAT-2 y el que contiene Venus, junto al vector que porta el gen de la enzima transposasa *Sleeping Beauty* (SB). **2X**: tratamiento idéntico al anterior pero doblemente concentrado.

Cada tratamiento se mezcló en vórtex y luego se mantuvo a temperatura ambiente por 15 minutos para permitir la formación del complejo PEI-ADN.

Por último, se transfirieron las mezclas de transfección a los pocillos de la placa con el cultivo de células preparado el día anterior. Éstos fueron colocados en estufa de cultivo a 38,5 °C, con una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire y máxima humedad. Se incubaron por 48 horas y se observó la expresión de la proteína fluorescente en un microscopio de fluorescencia, como primer indicio de transfección. Una vez evidenciado el gen reportero de la mencionada proteína, se procedió a iniciar la selección con G418, durante 21 días. Este procedimiento permitió obtener colonias monoclonales y transgénicas aisladas, ya que sólo perduraron las células que lograron insertar en su genoma el transposón con el gen de resistencia a antibiótico y el de nuestra enzima de interés, mFAT-2, y el transposón con la proteína Venus.

4.14.9. Obtención de líneas monoclonales transgénicas.

Luego de los días de selección con G418, se formaron colonias aisladas de células resistentes al antibiótico. Para obtener las células de cada colonia, se utilizaron anillos de clonado, o *cloning rings*, los cuales consisten en pequeños cilindros de plástico de 7 mm, estériles, que fueron colocados sobre cada colonia previamente identificada bajo la luz azul en el microscopio. Se agregó dentro de cada anillo de clonado 50 μ L de tripsina 0,05 % p/V, se incubó 5 minutos en estufa y las células obtenidas fueron colocadas en placas MW-24 con 500 μ L de medio de cultivo en cada pocillo. Aquellas colonias que mantuvieron un potencial de crecimiento y lograron llegar a confluencia en la placa, fueron tripsinizadas y colocadas secuencialmente en placas de mayor superficie, es decir, desde MW-6, frascos de cultivo de 25 y finalmente de 75 cm³. Cada colonia expandida fue criopreservada en nitrógeno líquido, como se describió previamente.

4.14.10. Extracción de ADN genómico a partir de líneas monoclonales.

Luego de 21 días de selección con el antibiótico y la expansión clonal, dos líneas de células transgénicas (y un cultivo de MAC-T *wild type* como control negativo) se sometieron a la extracción del ADN genómico, para la cual se utilizó el kit comercial Quick-gDNA® MiniPrep (Zymo Research) según las instrucciones del fabricante. Seguido de la extracción, se procedió a correr las muestras obtenidas en un gel de agarosa al 1 % para analizar la integridad del ADN de cada una de ellas.

A su vez, para determinar si el transposón se integró en el genoma bovino, se realizó un análisis por PCR del ADN genómico con cebadores específicamente diseñados, como se explica en el siguiente apartado.

4.14.11. Análisis de la integración del gen de la desaturasa mFAT-2 al genoma bovino por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Primer3 (Untergasser y col., 2012) y sus secuencias (5'→3') son las siguientes:

- FAT-2-F: TGTAGTGCAGATACTTGAAAAACCA
- FAT-2-R: ACTATAGCGTGTACACATTCGTCAA

El tamaño del amplicón fue de 369 pb.

Las condiciones optimizadas para las reacciones de PCR fueron las siguientes:

Tabla N° 4. Mezclas de reacción para PCR.

| | |
|---|-------------------|
| Buffer (10 X) | 1 μ L |
| Cl₂Mg (25mM) | 1,6 μ L |
| dNTPs (10mM) | 0,2 μ L |
| Primer Forward (50 μM) | 0,2 μ L |
| Primer Reverse (50 μM) | 0,2 μ L |
| Taq Polimerasa (5u/ μL) | 0,5 U |
| ADN Plasmídico | 50 ng |
| H₂O | c.s.p. 10 μ L |

Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las que se detallan en la **Tabla N° 5**.

Tabla N° 5. Descripción de ciclos de PCR.

| Protocolo PCR (30 ciclos) | |
|----------------------------------|---------------------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C / 5 minutos |
| Desnaturalización | 95 °C / 20 segundos |
| Hibridización | 60 °C / 20 segundos |
| Elongación | 72 °C / 30 segundos |
| Elongación final | 72 °C / 5 minutos |

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % durante 90 minutos, a 100 V, en buffer TAE 1X. Se sembraron 5 μ L de muestra mezclados con 2 μ L de buffer de siembra, también llamado *Loading Buffer* (glicerol 30 % azul de bromofenol). Como control negativo, se sembró en una calle ADN genómico de células MAC-T sin transfectar (*wild type*). Por otro lado, se utilizó como control positivo muestra de ADN plasmídico conteniendo el gen en cuestión, para confirmar la funcionalidad de los cebadores diseñados.

4.14.12. Determinación de la proporción de ω -6 y ω -3 por cromatografía gaseosa para evaluar la actividad desaturasa en células transgénicas.

Luego de confirmar la presencia del transgen *fat-2* en el genoma de las células MAC-T mediante PCR, se procedió con la extracción de lípidos de estas líneas celulares, para evaluar la funcionalidad de la enzima recombinante, es decir, la capacidad de producir insaturaciones en AG saturados. Para ello, en primer lugar, se dejaron crecer dos líneas monoclonales transgénicas (denominadas en adelante M1 y M2) hasta confluencia, en frascos de 75 cm³, para obtener un peso seco mayor a 20 mg de células de cada cultivo. De la misma manera, se procedió con un cultivo de MAC-T sin transfectar WT (*wild type*) como control negativo del experimento, ya que el genoma de bovinos carece de los genes que codifican para la desaturasa mFAT-2 y sin la presencia de esta enzima no es posible hallar AG ω -6 y ω -3 en bovinos.

A continuación, se siguió con un protocolo para la extracción de fosfolípidos totales de bacterias (Heredia y col., 2014) con las adaptaciones necesarias para cultivos celulares.

El primer paso fue cosechar las células, para lo cual se retiró el medio de cultivo de cada línea (M1, M2 y *wild type*), se lavaron con PBS para retirar restos de medio, se les agregó 1 mL de tripsina durante 5 minutos a 37 ° C, se inactivó la tripsina con 1 mL de medio y se centrifugaron en tubos de 15 mL a 3000 rpm durante 5 minutos.

Para extraer los fosfolípidos de los tres cultivos de MAC-T, se agregó una mezcla 2:1 de metanol-cloroformo a los *pellets* de células, se agitaron durante 1,5 horas y se centrifugaron en frío a 6021 g por 15 minutos. A los sobrenadantes se les adicionaron partes iguales de cloroformo y de agua, agitando por 5 minutos en vortex, seguido de una centrifugación por 5 minutos a 847 g. Se extrajo la fase inferior de cada cultivo y se mantuvieron conservados en heladera hasta la derivatización.

En éste último proceso mencionado se logran obtener ácidos grasos metilados, los que posteriormente son identificados por cromatografía de gases. Se secaron en una corriente de nitrógeno los fosfolípidos de la fase clorofórmica obtenida en el paso anteriormente descrito. Se agregó una solución de trifluoruro de boro en metanol (BF₃_MeOH) y se incubó 2 horas en baño maría a ebullición. Luego se corrigió el volumen evaporado con metanol. Se adicionaron 1 parte de agua y 2 de hexano a las muestras. Se extrajo la fase superior de cada tubo, se colocaron en recipientes nuevos y se redujeron en corriente de nitrógeno hasta realizar la cromatografía gaseosa.

La determinación de perfiles de ácidos grasos por Cromatografía Gaseosa fue realizada por el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), en la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

El equipo empleado fue un cromatógrafo gaseoso GCFID Clarus 500 Perkin Elmer. Los datos fueron adquiridos empleando el programa TurboMass 6.1.0. Columna: Elite Wax (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm de espesor de film), marca Pekin Elmer. Carrier: nitrógeno: 1 mL/min. Inyector: 250°C. Detector FID: 250°C. Programa: Temp. Inicial: 180°C, rampa: 2°C/min hasta 220 °C (20 min). Las muestras se inyectaron en modo Splitless. Volumen inyección: 1 μL .

Para el análisis de datos, se observaron las gráficas obtenidas y las tablas que resultan del cromatógrafo, interpretándose como funcionales las enzimas de las líneas transgénicas que presentan AG insaturados en su perfil, siempre que el control negativo haya dado ausencia de este tipo de AG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de ovarios y ovocitos.

Se ha establecido claramente que la calidad intrínseca del ovocito es uno de los factores determinantes de la tasa de producción de blastocistos. Controlar factores como la etapa del ciclo estral, la etapa de onda folicular, el origen de los ovarios, entre otros, resulta difícil cuando se utilizan ovarios que provienen de animales de mataderos. Esto hace que sea necesario realizar una caracterización de los ovarios y los ovocitos de esta proveniencia ya que presentan gran heterogeneidad en sus características y, por lo tanto, la calidad del ovocito es muy variable.

5.1.1. Caracterización de ovarios según la presencia de estructuras relacionadas al cicloestral.

La presencia de estructuras relacionadas con el ciclo estral en los ovarios parece estar conectada con la competencia de los ovocitos para el desarrollo embrionario. Por este motivo fue que se realizó una caracterización de los ovarios provenientes de animales faenados según la **presencia de CL** (cuerpo lúteo), **FD** (folículo dominante), **ambas estructuras (CL+FD)** o **ninguna (NO)**, y de acuerdo al tamaño de los folículos visualizados en la superficieovárica, que son los posteriormente aspirados.

La **Tabla N° 6** resume los porcentajes de ovarios, de cinco repeticiones independientes entre sí, que indican la presencia/ausencia de estructuras del ciclo estral en los 149 ovarios analizados en total.

Tabla N° 6. Porcentaje de ovarios según la presencia de cuerpo lúteo (CL), folículo dominante (FD), ambas estructuras (CL+FD) o ausencia de ellas (NO).

| Estructuras analizadas | n | Porcentaje (media ± EE) |
|------------------------|---|-------------------------|
| CL | 5 | 14,16 ± 4,55 % |
| FD | 5 | 23,90 ± 5,09 % |
| NO | 5 | 19,22 ± 3,76 % |
| CL+FD | 5 | 42,71 ± 8,82 %* |

*p<0.05 vs porcentaje de ovarios con CL+FD. Los valores indican las medias ± error estándar de 5 experimentos.

Luego de realizar el respectivo análisis de varianza ANOVA y un test de bondad de ajuste (Test de Bonferroni) puede observarse que los ovarios que presentan tanto CL como FD en su estructura fueron los que se encontraron en mayor proporción respecto de aquellos que presentaron un solo tipo de estructura (CL o FD) o ninguna de ellas.

La relevancia de realizar este tipo de caracterización radica en poder establecer un método sencillo y no invasivo para optimizar la selección de ovocitos competentes para ser utilizados en tecnologías de reproducción *in vitro* en un futuro. Estudios anteriores que se basan en la selección de ovarios según la presencia de estas estructuras difieren entre sí. Para Varisanga y col. (1998), la presencia de un FD en uno o ambos ovarios de un par tiene un efecto negativo en el desarrollo de embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro* (FIV). Otros estudios (KaramiShabankareh y col., 2015; Hajarian y col., 2016) demostraron que existen efectos negativos sobre la competencia de ovocitos bovinos que provienen de ovarios que presentan CL en su estructura. En contraposición, Manjunatha y col. (2007) concluyeron que el desarrollo de ovocitos fue máximo en pares de ovarios con cuerpo hemorrágico o CL y sin FD.

A pesar de las discrepancias encontradas entre los autores, la selección de ovarios basada en la presencia de estructuras relacionadas con el ciclo estral podría contribuir con la optimización del acceso a ovocitos con mejor competencia de desarrollo para tecnologías *in vitro*. Sin embargo, los efectos positivos o negativos de las estructuras ováricas sobre la competencia de los ovocitos en este sistema requieren más investigaciones para determinar cómo estas afectan el desarrollo embrionario posterior (Aguila y col., 2020).

5.1.2. Caracterización de ovarios según el tamaño de los folículos.

El **tamaño de los folículos ováricos** es otro de los criterios comúnmente utilizados para la obtención de COCs de buena calidad (Hyttel y col., 1997; Aguila y col., 2020). En la **Tabla N° 7** se pueden observar los porcentajes hallados para las tres categorías creadas, luego de realizar el análisis estadístico correspondiente (ANOVA y test de Bonferroni) de cinco repeticiones independientes entre sí.

Tabla N° 7. Porcentajes de folículos ováricos según rango de tamaño.

| Rango de tamaño (mm) | n | % (media ± EE) |
|----------------------|---|------------------|
| 0 – 3 | 5 | 66,71 ± 8,97 %* |
| 3 – 8 | 5 | 32,31 ± 8,63 %** |
| > 8 | 5 | 0,96 ± 0,67 % |

* $p < 0.05$ vs porcentaje de ovarios con folículos de tamaño 3-8 mm y vs > 8 mm. ** $p < 0.05$ vs porcentaje de ovarios con folículos de tamaño 0-3 mm y vs > 8 mm. Los valores indican las medias ± error estándar de 5 experimentos.

El tamaño de folículos que se encontraron en un porcentaje significativamente mayor en la periferia de los ovarios utilizados correspondió al rango de 0-3 mm, en un porcentaje de 66,71 %. En segundo lugar, siguieron los folículos de entre 3-8 mm de diámetro, con 32,31%, quedando en último lugar los que presentaron un tamaño mayor a 8 mm, en un valor cercano al 1 %.

El tamaño de folículos que se utilice dependerá del método de obtención de ovocitos (aspiración folicular, *slicing*, *ovum pick up*) y del tipo de maduración del que se hable (*in vivo* o *in vitro*). *In vivo*, los ovocitos que logran reanudar la meiosis son los que provienen de FD con un tamaño de 15 mm aproximadamente (Pavlok y col., 1992). Para seleccionar los COCs potencialmente competentes para madurar *in vitro*, generalmente se emplean folículos que no superen los 8-10 mm (Pavlok y col., 1992; Hansen Laboratory, 2017). Pavlok y col. (1992) agruparon los COCs según tres rangos de tamaño de folículos: los menores de 2 mm se designaron como pequeños, medianos los que presentaron entre 2 y 4 mm, y grandes los folículos de 4 a 8 mm de diámetro; y encontraron que los ovocitos provenientes de folículos medianos y grandes fueron los que presentaron mayor potencial de desarrollo respecto de los pequeños. Hyttel y col. (1997) clasificaron como folículos antrales pequeños a los que median entre 3 y 5 mm y medianos los que presentaron un diámetro entre 6 a 10 mm.

Es decir que los folículos visibles en la corteza de los ovarios provenientes de animales sacrificados en mataderos, específicamente del Frigorífico Coronel Moldes, pueden ser en su mayoría aspirados y utilizados para maduración *in vitro*, FIV, cultivo embrionario, entre otras metodologías, ya que aproximadamente el 1 % de los folículos presentan más de 8 mm

de diámetro. Respecto de los folículos del rango 0-3 mm sería necesario realizar una clasificación más detallada para contabilizar la cantidad de folículos entre 2 y 3 mm.

5.1.3. Caracterización de complejos cúmulus-ovocitos (COCs) según el revestimiento de los ovocitos por las células del cúmulus.

Para comenzar con una caracterización más amplia de las muestras, se determinó la variable **Cobertura de los COCs**. Esta da cuenta del revestimiento del ovocito por las capas de células del cúmulus (CC). Para ello, previamente se aspiraron los folículos ováricos, se realizó la búsqueda de COCs, y se tomaron fotografías de los mismos, como se explica en la sección de Materiales y Métodos.

Se emplearon tres categorías de clasificación de acuerdo al revestimiento del ovocito por las CC, siendo:

- Cobertura **Total** para los ovocitos cubiertos en todo su perímetro por CC.
- Cobertura **Parcial** para los ovocitos que no estaban completamente cubiertos por CC.
- Desnudos** los ovocitos que no presentaban CC a su alrededor.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N°8.

Tabla N° 8. Porcentajes de complejos cúmulus-ovocitos (COCs) según cobertura del ovocito por las células del cúmulus.

| Revestimiento del ovocito por las células del cúmulus | Porcentaje (media \pm EE) |
|---|-----------------------------|
| Desnudos | 1,90 \pm 1,90 % |
| Parcial | 10,27 \pm 6,88 % |
| Total | 87,83 \pm 8,74 %* |

* $p < 0.05$ vs porcentaje de COCs desnudos y vs porcentaje de COCs cubiertos parcialmente por las células del cúmulus. Los valores indican las medias \pm error estándar de 4 experimentos.

A partir de estos resultados, se puede observar que, del total de folículos corticales obtenidos a partir de ovarios provenientes de animales faenados, alrededor del 90 % se encontraban completamente recubiertos por CC. En la producción *in vitro* de embriones, se considera que los COCs de buena calidad presentan ciertas características morfológicas, como capas de CC compactas y completas, un ooplasma homogéneo con una granulación fina y color marrón (Ihazeleper y col., 1994; Hansen Laboratory, 2017). El hecho de que esta característica intrínseca de la materia prima con la que se trabajó presente un alto porcentaje de COCs con total cobertura representó un importante punto de partida para utilizarlos en un futuro para la producción de embriones *in vitro*.

En las siguientes caracterizaciones, sólo se tuvieron en cuenta los COCs con cobertura total debido al alto porcentaje hallado en las muestras de ovarios utilizadas.

5.1.4. Caracterización de complejos cúmulus-ovocitos (COCs) según la cantidad de capas y el espesor de las células del cúmulus.

Posteriormente, se analizó si las observaciones del parámetro cualitativo **Capas de CC** estaban relacionadas con la variable cuantitativa **Espesor de las capas de CC**. El objetivo fue comprobar si lo que se observó visualmente y subjetivamente se corresponde con valores medibles y cuantificables para así establecerlo como método de selección de ovocitos.

Como se explicita en la sección Materiales y Métodos, dentro de la población analizada se asignaron como “1” a los COCs que se visualizaban con la mínima cantidad de capas de CC, “2” para los que presentaban una cantidad intermedia de capas de CC, y “3” a los que se observaron con la máxima cantidad de capas de CC (más de 5) (Palma G, 2007).

Con la intención de determinar si existía relación entre la variable cualitativa y la variable cuantitativa, se determinó el espesor **promedio** de capas de CC de COCs con cantidad de capas 1, lo mismo para los COCs con cantidad de capas 2 y 3. Los valores obtenidos (para cuatro réplicas experimentales) fueron:

- Promedio del espesor de las capas de CC de COCs con cantidad de capas 1: 0.05 mm.
- Promedio del espesor de las capas de CC de COCs con cantidad de capas 2: 0.08 mm.

-Promedio del espesor de las capas de CC de COCs con cantidad de capas 3: 0.13 mm.

Además, con el propósito de validar estadísticamente si había diferencia significativa entre estos tres promedios y así poder agrupar en tres categorías cuantitativas (espesor promedio de 0.05, 0.08 y 0.13 mm) a las características observadas (cantidad de capas 1, 2 y 3), se determinó la varianza (ANOVA) mediante el programa InfoStat, acompañado de un test de bondad de ajuste, Test de Bonferroni. La **Tabla N° 9** muestra los valores obtenidos.

Tabla N° 9. Promedios de las determinaciones de espesor de las capas de células del cúmulus (CC) de complejos cúmulus-ovocitos (COCs) con cantidad de capas 1, 2 y 3.

| Clasificación de COCs según la cantidad de capas | n | Espesor de las capas (media ± EE) |
|--|---------------|-----------------------------------|
| 1 | 18 (8,57 %) | 0,05 ± 0,01 mm* |
| 2 | 70 (33,33 %) | 0,08 ± 0,004 mm** |
| 3 | 122 (58,09 %) | 0,13 ± 0,003 mm |

* $p < 0,05$ vs espesor promedio de capas de CC 0,08 mm y vs espesor promedio de capas de CC 0,13 mm. ** $p < 0,05$ vs espesor promedio de capas de CC 0,03 mm y vs espesor promedio de capas de CC 0,13 mm. Los valores indican las medias ± error estándar de 4 experimentos.

Como se puede observar en la tabla anterior, existe diferencia significativa en el espesor promedio de capas de CC de cada grupo, con lo cual se pudieron establecer tres categorías diferentes en relación a las variables cantidad y espesor de capas de CC. Es decir que la variable Cantidad de capas 1 se corresponde con el espesor promedio de capas de CC 0,05 mm, Cantidad de capas 2 se corresponde con espesor promedio de capas de CC 0,08 mm y Cantidad de capas 3 se corresponde con espesor promedio de capas de CC 0,13 mm.

La relevancia de estos resultados radica en que se logró transformar una característica de selección de COCs cualitativa y subjetiva en una cuantitativa y objetiva ya que lo que se determinó visualmente como cantidad de capas de CC óptima resultó ser la que presentó mayor espesor. Lo mismo para las otras dos categorías. Debido a que los criterios utilizados para clasificar y seleccionar los ovocitos varían entre los investigadores, podrían malinterpretarse fácilmente y dependen de la evaluación y la experiencia del experto (Aguila y col., 2020), con lo cual esta medición podría constituirse como un nuevo marcador objetivo

de COCs potencialmente competentes. Además, es un método no invasivo ya que con simple observación en lupa o microscopio puede determinarse dicha variable.

Con estos resultados, se pudo determinar además que las muestras de ovarios utilizadas, presentaron COCs en un 58,09 % que correspondieron a la categoría con mayor espesor promedio de capas de CC, y un 33,33 % a la categoría con espesor promedio de 0.08 mm (total 91,42 %). Es decir que las muestras provenientes del Frigorífico Coronel Moldes son de excelente calidad en cuanto a las características intrínsecas hasta ahora analizadas de Cobertura y Cantidad o espesor de capas de CC.

5.1.5. Caracterización de COCs según el grado de compactación de las células del cúmulus.

Con respecto al grado de **Compactación** que presentaron las CC de los COCs aspirados, se distinguieron tres categorías: compactas, ligeramente relajadas y relajadas. Tal como se expresó en la sección de Materiales y Métodos, se designaron como **compactas** las CC que estaban fuertemente asociadas entre sí; **ligeramente relajadas** las CC que, si bien estaban estrechamente asociadas entre sí, en algunas zonas comenzaban a notarse CC más relajadas; y **relajadas** las CC que parecían estar levemente asociadas, y generalmente se las relaciona con signos de atresia (Palma G., 2007).

Los resultados obtenidos de cuatro repeticiones independientes entre sí pueden observarse en la Tabla N° 10.

Tabla N° 10. Grado de compactación de las células del cúmulus

| Grado de compactación | Porcentaje (media ± EE) |
|------------------------------|--------------------------------|
| Compactas | 69,66 ± 7,86 %* |
| Ligeramente relajadas | 21,92 ± 7,86 % |
| Relajadas | 8,41 ± 7,86 % |

*p<0,05 vs Ligeramente relajadas y vs Relajadas. Los valores indican las medias ± error estándar de 4 experimentos.

Las muestras analizadas presentaron COCs con CC compactas en un porcentaje significativamente superior respecto de las categorías ligeramente relajadas y relajadas.

Teniendo en cuenta los criterios de selección de COCs de autores como Aguila y sol. (2020) y Madison y col. (1992), tanto los que presentan CC compactas como los que tienen CC ligeramente relajadas o expandidas son elegidos y caracterizados como COCs de buena calidad para posteriores ensayos *in vitro*. Sobre la base de estos principios, las muestras de ovarios provenientes del Frigorífico local poseen el 91,58 % de COCs con CC compactas o ligeramente relajadas, consideradas de buena calidad para ser empleados en tecnologías de producción *in vitro* de embriones.

Es decir que alrededor del 90 % de COCs aspirados de las muestras utilizadas poseen intrínsecamente las características Cobertura, Espesor de las CC y Compactación de buena calidad para ser escogidos para ensayos *in vitro*.

5.1.6. Caracterización de ovocitos según la homogeneidad del ooplasma.

En cuanto al ooplasma, típicamente son seleccionados aquellos ovocitos que presentan un citoplasma uniformemente granulado, sin espacios claros, para realizar la maduración *in vitro* (Hansen Laboratory, 2017). Sobre la base de este criterio, se analizó el citoplasma de los ovocitos según su **homogeneidad** en Homogéneos (los que presentaron un ooplasma granulado homogéneamente) y No homogéneos (en los que se visualizaban zonas con mayor densidad de gránulos, espacios blancos o punteado negro).

Nuevamente, se encontró un alto porcentaje de ovocitos de buena calidad. Según la característica analizada, un $83,11 \pm 4,27$ % de los ovocitos estudiados presentaron un citoplasma granulado de manera homogénea. Ciertos trabajos de laboratorios de referencia (Leibfried y First, 1979) encontraron que los ooplasmas que presentan gránulos que se aglomeran o se distribuyen de manera desigual, fusionándose en cuerpos negros, o un citoplasma que presenta la zona pelúcida sin llenar uniformemente, son ovocitos con signos de atresia o degenerados, los cuales presentan baja o nula competencia para el desarrollo embrionario. Sin embargo, en estudios más profundos como los realizados por Nagano y col. (2006), donde relacionan las características del ooplasma de los ovocitos con su competencia para madurar y fertilizar *in vitro*, observaron que los gránulos negros no siempre indican atresia, sino que pueden deberse a acumulaciones lipídicas, las cuales están asociadas a un alto potencial de desarrollo. Estos autores concluyeron que un ooplasma

oscuro indica una acumulación de lípidos y un buen potencial de desarrollo, mientras que un ooplasma de color claro indica una bajadensidad de orgánulos, mientras que un ooplasma negro indica envejecimiento, ambos con bajo potencial de desarrollo.

Es decir que, si bien se obtuvieron altos porcentajes de ovocitos con citoplasmas homogéneos, el restante 17 % de ovocitos con ooplasmas No homogéneos deberían ser estudiados con mayor profundidad para determinar si el punteado negro visualizado corresponde a gotas lipídicas o presentan signos de atresia.

5.1.7. Caracterización cuantitativa de ovocitos.

Se realizaron también diferentes determinaciones de parámetros físicos sobre los ovocitos desnudos para caracterizarlos y encontrar posibles relaciones entre las medidas y la calidad de las muestras. Mediante el programa Fiji se realizaron las mediciones del **área**, el **perímetro** y el **diámetro del ooplasma** (excluyendo la zona pelúcida) y del **espesor de la zona pelúcida (ZP)**.

Luego de tres repeticiones experimentales independientes entre sí, se encontraron los siguientes promedios de las mencionadas medidas (Tabla N°11).

Tabla N° 11. Parámetros físicos determinados en ovocitos desnudos.

| Variable | Tamaño (media ± EE) |
|---|-----------------------------|
| Área del ooplasma | $12 \pm 0,37 \mu\text{m}^2$ |
| Perímetro del ooplasma | $387,5 \pm 10 \mu\text{m}$ |
| Diámetro del ooplasma | $123 \pm 1,1 \mu\text{m}$ |
| Espesor de la zona pelúcida (ZP) | $12,2 \pm 0,17 \mu\text{m}$ |

Los valores indican las medias \pm error estándar de 3 experimentos.

En cuanto al parámetro diámetro del ooplasma, el más utilizado como criterio de selección de ovocitos potencialmente competentes, Otoi y col. (1997) hallaron un valor promedio de $114,0 \pm 4,8 \mu\text{m}$ de tamaño. En ese mismo estudio, encontraron que el diámetro de los ovocitos está relacionado a la competencia de desarrollo, donde los ovocitos adquirieron

plena competencia meiótica a un diámetro de 115 μm , pero para adquirir plena competencia de desarrollo de los blastocistos se requirió un diámetro de 120 μm . Diferentes resultados se obtuvieron por Hyttel y col. (1997) donde se necesitó un diámetro de ovocito de aproximadamente 100 μm para adquirir plena competencia para la reanudación de la meiosis, y la total competencia para mantener el desarrollo embrionario se adquirió con un diámetro del ovocito de aproximadamente 110 μm .

En estudios realizados en ovocitos humanos, se encontró que existe relación entre el diámetro de la ZP y la capacidad de desarrollo de estos (Balakier y col., 2012). La misma asociación fue estudiada en ovocitos de cerdos y búfalos, con lo cual esta tendencia podría ser conservada en las diferentes especies, incluidos los bovinos (Timlin y col., 2021).

Las sutiles variaciones comentadas previamente entre diferentes sistemas resaltan la importancia del estudio realizado con nuestras propias muestras. Además, se observa a partir de los parámetros estudiados que la aplicación de estas metodologías simples, relativamente rápidas y de bajo costo permiten realizar una apropiada selección de ovocitos óptimos para su posterior utilización en ensayos de mayor complejidad.

5.1.8. Caracterización biológica de ovocitos.

Los ensayos biológicos realizados en los ovocitos provenientes de ovarios de hembras bovinas faenadas fueron: determinación de alteraciones en la morfología nuclear y el arresto en metafase de los ovocitos, viabilidad celular y potencial de membrana mitocondrial como indicador de la funcionalidad mitocondrial.

5.1.8.1. Integridad del ADN o morfología nuclear.

Para observar la presencia o ausencia de posibles alteraciones en la **morfología nuclear**, los ovocitos bovinos fueron teñidos con Hoechst ya que éste presenta una tinción fluorescente azul y se une específicamente al material genético. El 100 % de los ovocitos analizados presentaron integridad de su ADN tal como el observado en la Figura N° 8. Es decir que en ningún ovocito se evidenció alteración de la morfología nuclear. Esto resulta de gran importancia ya que alteraciones como ausencia de núcleo o material nuclear degenerado (Rodríguez Telles y col., 2004) impedirían continuar con procesos de maduración *in vitro* y, por ende, la fertilización *in vitro* o cualquier procedimiento para la producción de embriones.

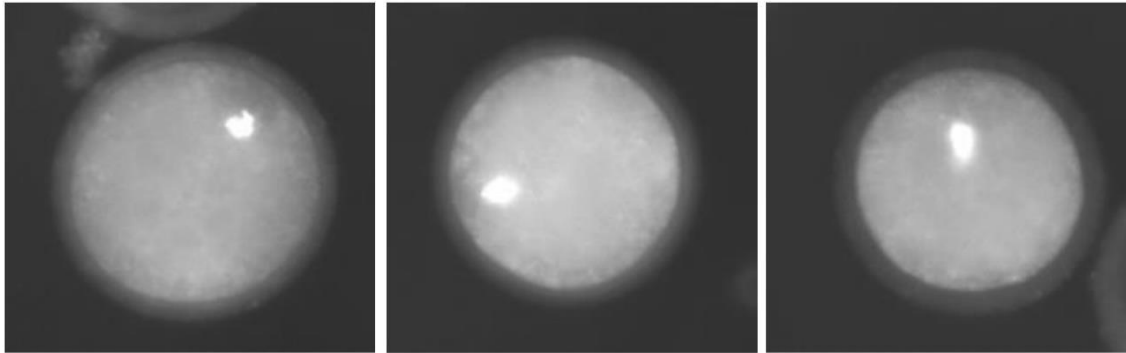


Figure N° 8. Microfotografías de ovocitos bovinos teñidos con Hoechst donde no se observan alteraciones en la morfología nuclear. Magnificación de 400x.

5.1.8.2. Viabilidad de ovocitos.

En cuanto a la determinación de la **viabilidad celular** de los ovocitos, se utilizó el colorante Ioduro de propidio (IP). El IP es indicativo de la pérdida de la selectividad de la membrana plasmática de las células ya que dicho colorante es impermeable a células con su membrana plasmática intacta. Con lo cual, los ovocitos con fluorescencia en su interior resultaron inviables ya que a pérdida de la selectividad de la membrana plasmática es una injuria grave para las células.

De los ovocitos teñidos con IP un $97,61 \pm 0,11$ % resultaron viables, es decir que no se visualizó fluorescencia en su interior.

Tal como lo mencionado con la determinación anterior, el alto porcentaje de ovocitos viables es vital para utilizar estas células en procesos de producción *in vitro* de embriones.

5.1.8.3. Potencial de membrana mitocondrial.

Por último, se evaluó la **actividad mitocondrial** de los ovocitos bovinos. Para ello se determinó el potencial de membrana de estas organelas mediante tinción con Rodamina 123 (R123). El mecanismo para la absorción selectiva de este colorante en las mitocondrias reside en la atracción de la molécula catiónica de rodamina hacia el potencial electronegativo relativamente alto que existe a través de la membrana mitocondrial. Por lo tanto, proporciona medios para evaluar la fuerza motriz total de protones dentro de la masa mitocondrial que puede reflejar los requisitos de ATP en las células (Smith LC, 1993).

Como resultado, se encontró que el total de los ovocitos analizados resultó presentar

actividad mitocondrial, es decir que todos los ovocitos teñidos con R123 fueron visualizados fluorescentes. Luego de tomar fotografías y medir la intensidad de fluorescencia emitida por los ovocitos mediante el programa Fiji, se realizaron los cálculos de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) y se establecieron tres subpoblaciones según rangos de intensidad de fluorescencia con el objetivo de cuantificar los datos de fluorescencia positiva observados en las imágenes. Los resultados fueron los siguientes:

$$\text{CTCF baja} = 2,6 \times 10^7 - 5,7 \times 10^7.$$

$$\text{CTCF intermedia} = 5,7 \times 10^7 - 8,3 \times 10^7.$$

$$\text{CTCF alta} = 8,3 \times 10^7 - 2,5 \times 10^8.$$

Se encontró que, del total de ovocitos (n=54 ovocitos), el 33,33% fue el porcentaje hallado en cada rango por igual, siendo un total del 66,66 % los ovocitos con funcionalidad mitocondrial entre intermedia y alta.

Los resultados encontrados para estas tres determinaciones biológicas de los ovocitos demuestran que los ovarios provenientes de animales faenados, específicamente del Frigorífico Coronel Moldes, que se utilizan como materia prima para la obtención de COCs, son viables en su mayoría, con su material genético íntegro, y que presentan funcionalidad mitocondrial luego de su obtención, transporte, aspiración y selección.

Al finalizar las caracterizaciones tanto de los ovarios como de sus respectivos COCs y ovocitos de las muestras utilizadas, se procedió a evaluar la capacidad de maduración de estos últimos.

5.1.9. Maduración *in vitro* y determinación del diámetro de ovocitos maduros.

El porcentaje de maduración hallado (n=1500 ovocitos) en tres repeticiones independientes entre sí fue del 70 %, donde los criterios de selección de ovocitos sometidos a MIV fueron los típicamente utilizados para la PIV de embriones: ooplasma marrón o pardo y homogéneo, rodeados por una cobertura compacta y multicapa de células del cúmulus (Leibfried y First, 1979; Hansen Laboratory, 2017). Se han publicado diversos resultados en relación a la progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro*, encontrándose que las tasas de maduración oscilan entre un 50 % y un 80 % (Rodríguez Telles y col., 2004).

Se han realizado estudios donde prueban que la competencia para completar la maduración meiótica hasta la metafase II (MII) y el tamaño medido en diámetro de los ovocitos está relacionado con esta capacidad (Hyttel y col., 1997). Estos autores midieron los diámetros de los ovocitos previo a la MIV y encontraron que los de tamaño entre 110-119 μm y \geq a 120 μm son los que lograron alcanzar la MII en mayores porcentajes (76 y 81 %, respectivamente) que los ovocitos más pequeños (entre 100 y 110 μm). Arlotto y col. (1996) obtuvieron resultados similares, pero en su trabajo estudiaron ovocitos hasta un diámetro máximo de 134 μm .

En el presente trabajo, los ovocitos que presentaron un tamaño \geq a 133,5 μm representaron un 13,38 %, y el rango de menor tamaño (100-109 μm) un 3,52 %. Es decir que, del total de ovocitos recuperados, más del 15 % podrían ser ovocitos que no llegarían a madurar por su bajo potencial de maduración, en el caso de los más pequeños, o por estar degenerados en el caso de los de mayor diámetro.

5.1.10. Comparación entre las características medidas en ovocitos pre y post maduración in vitro (MIV).

Siguiendo con las caracterizaciones de las muestras provenientes del frigorífico local, se evaluaron los posibles cambios en las mediciones estudiadas en los ovocitos posteriores al proceso de MIV. La Tabla N° 12 muestra los resultados comparativos obtenidos.

Tabla N° 12. Comparación entre mediciones realizadas previas y posteriores a la maduración in vitro (MIV) en complejos cúmulus-ovocitos y ovocitos desnudos.

| Características | Pre-MIV (μm) | Post-MIV (μm) |
|---|---------------------------|----------------------------|
| Área del ooplasma | 10 \pm 0,59 | 40 \pm 0,73* |
| Perímetro del ooplasma | 380 \pm 4,00 | 710 \pm 4,90* |
| Diámetro del ooplasma | 120 \pm 1,30 | 230 \pm 1,60* |
| Espesor de la zona pelúcida (ZP) | 10 \pm 1,20 | 20 \pm 1,50* |
| Expansión de las células del cúmulus (CC) | 110 \pm 10,00 | 370 \pm 20,00* |

* $p \leq 0.05$ vs ovocitos Pre-MIV.

Como puede observarse, el proceso de maduración *in vitro* incrementó significativamente todos los tamaños medidos en los ovocitos desnudos. Hasta el momento no se encontraron estudios donde realicen estas determinaciones cuantitativas para ser asociadas a la capacidad de maduración y desarrollo embrionario. Un parámetro muy utilizado como indicador indirecto de la calidad de los ovocitos es el grado de expansión de las CC luego de la maduración *in vitro*.

Kobayashi y col. (1994) y Aguila y col. (2020) estudiaron los efectos de factores de crecimiento, las gonadotropinas LH y FSH y el suero fetal bovino agregado al medio TCM199, en la MIV mediante la expansión y la fertilización de COCs bovinos y en el desarrollo embrionario posterior. Si bien no realizan mediciones para determinar la magnitud de la expansión, establecen tres categorías: 1-expansión modesta, caracterizada por pocos cambios morfológicos en comparación con antes de la maduración, 2- expansión parcial, y 3-expansión completa o casi completa. Otros estudios establecen que la expansión de las CC no necesariamente está asociada a la calidad o rendimiento de blastocitos, pero sí juega un rol importante en el proceso de fertilización por inducir la reacción del acrosoma (Aguila y col., 2020).

Si bien el hecho de remover las CC para realizar estas mediciones es una técnica de naturaleza terminal por no permitir la continuidad de procesos como FIV, puede ser utilizada para seleccionar ovocitos competentes o maduros en técnicas como microinyección de cigotos, TNCS, ICSI.

5.2. Caracterización morfológica del primer cuerpo polar de ovocitos bovinos maduros y su relación con la calidad ovocitaria.

5.2.1. Clasificación morfológica del primer cuerpo polar de ovocitos madurados *in vitro*.

Con el objetivo de determinar el valor predictivo de competencia ovocitaria que podría tener la morfología del primer cuerpo polar (CP) en ovocitos bovinos, se realizó una clasificación de estos según Hu y col. (2014) en:

- Ovocitos de grado A:** presentan el primer cuerpo polar con superficie fragmentada.
- Ovocitos de grado B:** su primer cuerpo polar presenta una superficie lisa o intacta.

-Ovocitos de grado C: cuerpo polar con superficie rugosa.

Como se explica en la sección de materiales y métodos, los ovocitos bovinos cultivados en medio de maduración y posteriormente desnudados enzimáticamente y mecánicamente, se fijaron en paraformaldehído al 3,7 % y se visualizaron en microscopio óptico invertido para clasificarlos según las características del cuerpo polar (Figura N° 9).

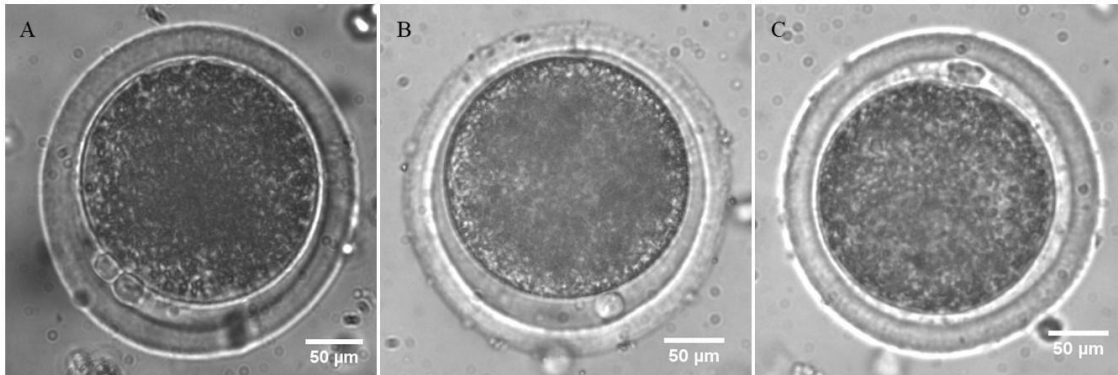


Figura N° 9. Microfotografías de ovocitos bovinos con extrusión del primer cuerpo polar. Según la morfología del primer cuerpo polar, se clasificaron en grado A (**A**), grado B (**B**), y grado C (**C**) Hu y col. (2014).

Al igual que en roedores (Jiao y col., 2012), porcinos (Hu y col., 2014) y humanos (Younis y col., 2009; Rose y Laky, 2013), se encontraron cuerpos polares fragmentados (Figura N° 9A). También, ovocitos con cuerpos polares lisos o intactos (Figura N° 9B) en los que se observó dicha estructura con bordes suaves y claros o refringentes y sin fragmentaciones evidentes. Finalmente, algunos ovocitos tenían cuerpos polares rugosos (Figura N° 9C) donde no se observaron segmentaciones del cuerpo polar pero la superficie se presentó opaca y con bordes poco definidos.

Como puede observarse en el gráfico de barras de la Figura N° 10, de un total de 108 ovocitos evaluados con extrusión del primer cuerpo polar visible, un $63,13 \pm 0,26$ % presentó cuerpo polar con morfología intacta (grado B), siendo un $22,86 \pm 2,21$ % fragmentados (grado A) y un $14,01 \pm 2,46$ % rugosos (grado C).

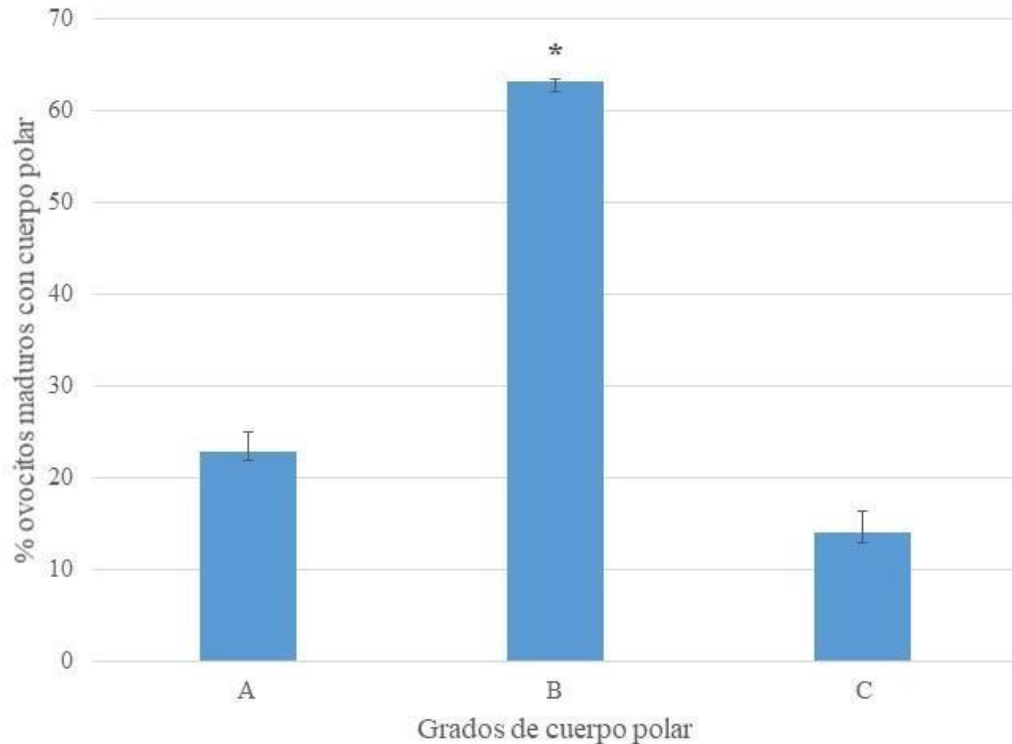


Figura N° 10. Gráfico de barras representativo del porcentaje de ovocitos bovinos maduros con cuerpo polar (CP) según grados morfológicos. **A:** ovocitos con CP fragmentado; **B:** ovocitos con CP intacto; **C:** ovocitos con CP rugoso. * $p < 0.05$ vs porcentaje de ovocitos con CP intacto (grado B). Los valores indican las medias \pm error estándar ($n=3$).

Hasta la fecha, no existen estudios que analicen la influencia de la morfología del primer cuerpo polar en la competencia ovocitaria en bovinos (Aguila y col., 2020). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas sobre ovocitos de otras especies (Younisy col., 2009; Jiao y col., 2012; Rose y Laky, 2013; Hu y col., 2014;), se podría hipotetizar que los ovocitos con cuerpo polar intacto (grado B) son los de mejor calidad también en bovinos. Si bien se requiere más investigación para establecer el valor predictivo real de la morfología del cuerpo polar y su relación con la competencia ovocitaria (Aguila y col., 2020), podría resultar en un método atractivo para incorporar en programas de reproducción asistida como ICSI, y transgénicas como clonado por TNCS o microinyección de cigotos.

5.2.2. Estudio de parámetros biológicos indicativos de calidad ovocitaria en relación a los diferentes grados de cuerpo polar en ovocitos madurados in vitro.

5.2.2.1. *Viabilidad celular según el grado de cuerpo polar (CP).*

Para cada grado de cuerpo polar de ovocitos maduros se evaluó la viabilidad mediante el colorante no vital yoduro de propidio (IP). Se consideraron ovocitos viables los que no presentaron fluorescencia en su ooplasma por tener intacta su membrana plasmática y así excluir al colorante IP. Por otro lado, se catalogaron no viables los ovocitos con fluorescencia en el ooplasma, indicativo de pérdida de la integridad de su membrana citoplasmática.

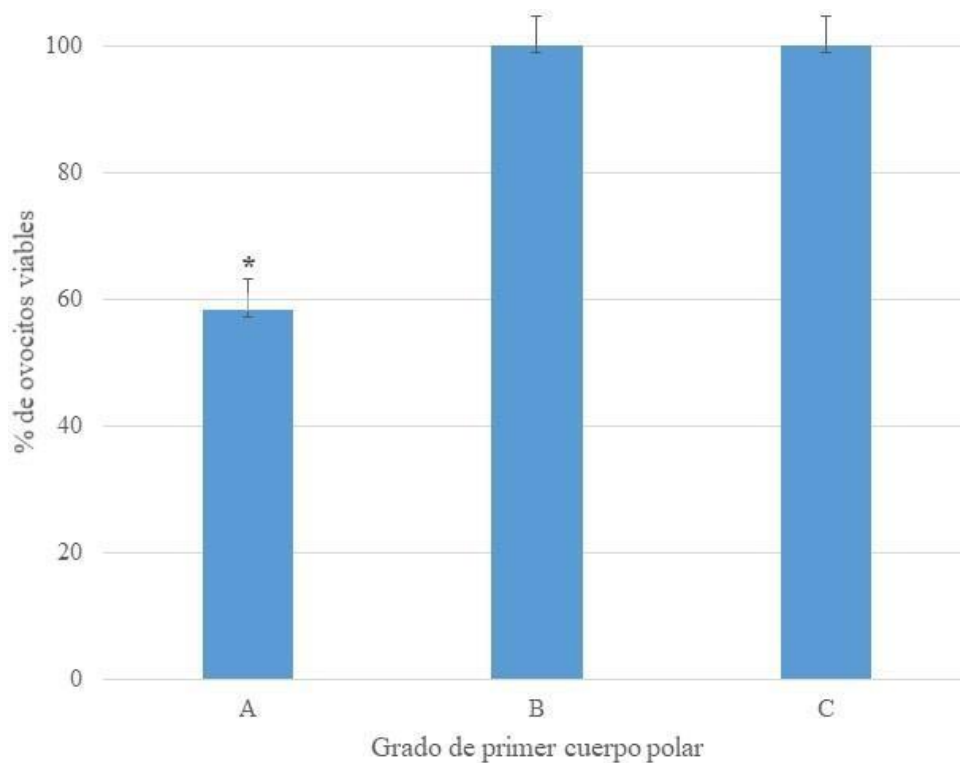


Figura N° 11. Porcentaje de ovocitos viables (sin fluorescencia) para los diferentes grados de cuerpo polar (CP) de ovocitos maduros. **A:** ovocitos con CP fragmentado; **B:** ovocitos con CP intacto; **C:** ovocitos con CP rugoso. * $p < 0,05$ vs porcentaje de viabilidad de ovocitos con CP fragmentado (grado A). Los valores indican las medias \pm error estándar (n=3).

Como puede observarse en el gráfico de barras de la Figura N° 11, resultaron viables el 100 % de los ovocitos con primer CP intacto y rugoso (grado B y C, respectivamente). A diferencia de los ovocitos con CP grado B y C, los ovocitos con primer CP fragmentado (grado A), presentaron su membrana citoplasmática íntegra un $58,33 \pm 4,81$ %. Es decir que existe un $41,66 \pm 4,81$ % de ovocitos con CP grado A que son inviables, ya que el IP, colorante impermeable a la membrana plasmática, pudo ingresar al ooplasma por pérdida de

su integridad, considerándose esta injuria como grave para las células (Bertuola M, 2019).

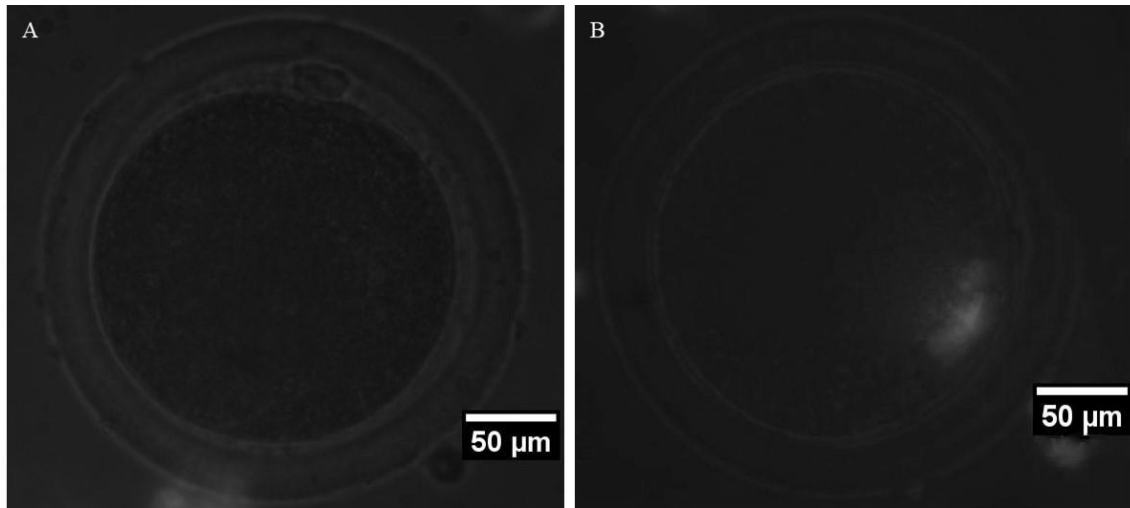


Figura N° 12. Microfotografías de ovocitos maduros teñidos con ioduro de propidio (IP). **A)** Ovocito grado C viable. **B)** Ovocito grado A inviable.

En las fotografías de la Figura N° 12 puede observarse un ovocito con CP fragmentado (B) que presenta fluorescencia en el interior de su ooplasma. Si bien no todo el citoplasma está teñido, cuando se compararon estos ovocitos con ovocitos viables (Figura N° 12A), pudo advertirse en el $41,66 \pm 4,81$ % de los ovocitos con CP grado A que han perdido la selectividad de su membrana plasmática, permitiendo así el ingreso del colorante no vital IP. Hasta el presente, no se han reportado estudios que relacionen la viabilidad ovocitaria con la morfología del primer cuerpo polar. Por lo tanto, nuestro estudio es el primero en demostrar una asociación entre la morfología del primer cuerpo polar y la viabilidad de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en función a la integridad de su oolema.

5.2.2.2. Niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) según grado de cuerpo polar (CP).

La producción de ERO se evaluó para cada grado de cuerpo polar en ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Como se explica en la sección Materiales y Métodos, los ovocitos maduros y desnudos se tiñeron con H₂DCFH-DA. Se incluyó como control positivo a ovocitos incubados en medio de maduración con menadiona (5 µM). Se visualizó la conversión del colorante mencionado en su forma fluorescente por la presencia de ERO en un microscopio de fluorescencia. Finalmente, se registraron fotografías de los ovocitos

teñidos para calcular la intensidad de fluorescencia corregida (CTCF) de cada grupo. La Figura N° 13 muestra los resultados obtenidos.

En el gráfico de barras de la Figura N° 13 puede observarse, por un lado, que la intensidad de fluorescencia corregida de los ovocitos madurados en presencia de menadiona fue significativamente superior a la encontrada en los ovocitos incubados sin este agente, por tratarse de un compuesto pro-oxidante (Cavallari y col., 2019). Por otro lado, se encontró que, si bien los niveles de ERO producidos por los ovocitos con CP fragmentado (A) y rugoso (C) son inferiores a los hallados en el control positivo del ensayo, resultaron significativamente superiores a los generados en ovocitos con CP intacto (B). No se han publicado estudios que establezcan algún tipo de relación entre la morfología del primer cuerpo polar con los niveles de ERO en ovocitos de mamíferos. Es ampliamente conocido que las especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno, tienen efectos nocivos sobre la supervivencia celular cuando está presente en altas concentraciones, lo que induce estrés oxidativo (Cheuquemán y col., 2015), pudiendo comprometer el desarrollo posterior de los embriones generados.

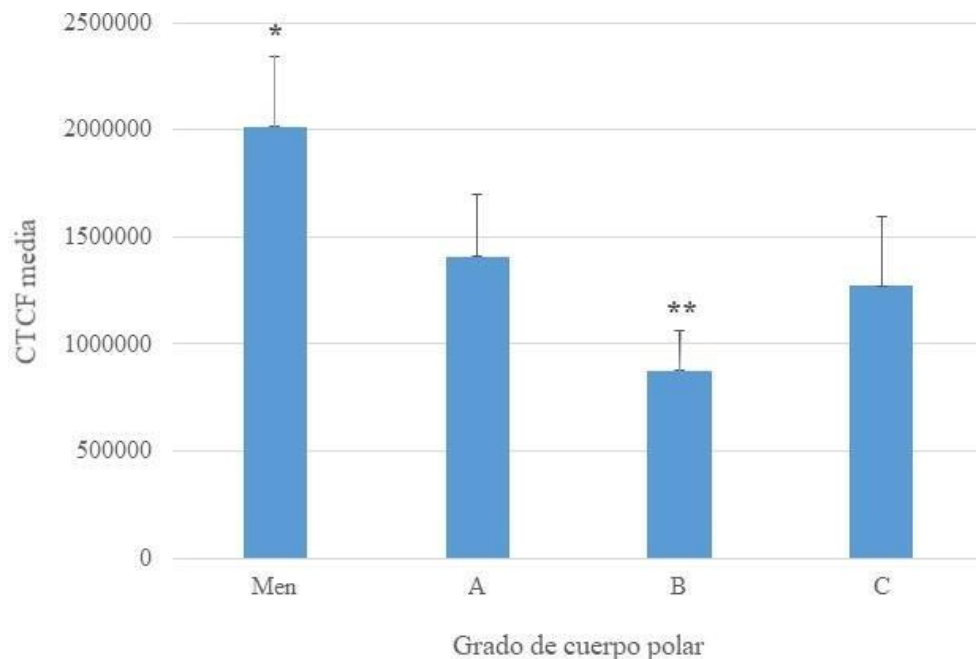


Figura N° 13. Gráfico de barras de la media de intensidad de fluorescencia corregida (CTCF) según el grado de cuerpo polar (CP) de ovocitos maduros. **(Men)** control positivo de ovocitos maduros incubados en medio de maduración con menadiona; **(A)** ovocitos con CP fragmentado; **(B)** ovocitos con CP intacto; **(C)** ovocitos con CP rugoso. * $p < 0,05$ vs CTCF de ovocitos control; ** $p < 0,05$ vs CTCF de ovocitos con CP intacto (grado B). Los valores indican las medias \pm error estándar de 2 experimentos.

Además, este resultado de producción de ERO de los ovocitos con CP intacto es coherente con el obtenido previamente en este mismo tipo de ovocitos respecto de la viabilidad. Es decir que los ovocitos con CP intacto (grado B) son los que presentan mejor calidad en cuanto a su viabilidad y su producción de especies reactivas del oxígeno, respecto de aquellos con CP fragmentado (grado A) o rugoso (grado C). Otros investigadores también han reportado una asociación positiva entre las características morfológicas del primer CP con la tasa de fertilización, la tasa de clivaje, la calidad embrionaria y la formación de blastocistos (Younis y col., 2009; Rose y Laky, 2013; Hu y col., 2014), donde observan principalmente que los ovocitos con CP fragmentado son los que presentan menor calidad y competencia respecto de los ovocitos con CP intacto.

Los resultados de este estudio y los de autores que trabajaron con otras especies de mamíferos refuerzan la hipótesis de este trabajo para establecer a la morfología del primer cuerpo polar como criterio de selección de ovocitos bovinos maduros competentes para ser utilizados en técnicas que requieren como material biológico inicial ovocitos maduros desnudos como ICSI, TNCS o microinyección de cigotos.

5.2.3. Intensidad de fluorescencia de gránulos corticales según el grado de cuerpo polar de ovocitos bovinos.

Con el fin de analizar la posible relación entre los eventos de maduración nuclear y citoplasmática según la morfología del primer cuerpo polar y la CTCF de los gránulos corticales (GC), respectivamente, ovocitos bovinos desnudos fueron teñidos con LCA-FITC. Esta es una tinción inmunocitoquímica que tiñe específicamente los gránulos corticales. A partir de fotografías de estos ovocitos se calculó la intensidad de fluorescencia corregida como se explica en la sección Materiales y Métodos.

En la Tabla N° 13 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que no existe diferencia significativa en la CTCF de los ovocitos teñidos según cada grado de CP.

Tabla N° 13. Intensidad de fluorescencia corregida de gránulos corticales de ovocitos teñidos con aglutinina de *lens culinaris* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (LCA-FITC) según el grado de cuerpo polar (CP).

| Grado de CP de ovocitos bovinos | Media ± EE |
|---------------------------------|---|
| A (fragmentado) | $1,1 \times 10^7 \pm 6,6 \times 10^6$ |
| B (intacto – liso) | $2,72 \times 10^9 \pm 2,71 \times 10^9$ |
| C (rugoso) | $5,04 \times 10^9 \pm 5,03 \times 10^9$ |

(A) ovocitos con CP fragmentado; (B) ovocitos con CP intacto; (C) ovocitos con CP rugoso. Los valores indican las medias ± error estándar de 3 experimentos.

Esto podría indicar que no hay diferencia en la cantidad de gránulos corticales que poseen los ovocitos evaluados en relación al tipo de CP que presenten. Sin embargo, las investigaciones enfocadas en el estudio de la maduración citoplasmática de ovocitos madurados *in vitro* muestran que una maduración citoplasmática completa es evidenciada por la disposición de los gránulos corticales en los ovocitos (Hosoe y Shioya, 1997; Hu y col., 2011; Pavani y col., 2020).

5.2.4. Disposición de gránulos corticales asociado al grado de cuerpo polar de ovocitos bovinos.

Los patrones de distribución de los GC se clasificaron de la siguiente manera (Hu y col., 2014):

- Tipo 1:** GC distribuidos en el citoplasma del ovocito, pero no en membrana plasmática.
- Tipo 2:** GC distribuidos en la corteza y formando un halo fluorescente alrededor de la membrana plasmática.
- Tipo 3:** GC distribuidos parcialmente en la membrana plasmática y en el citoplasma.

En un principio se utilizó la misma metodología de tinción que la empleada en el ensayo anterior donde se determinó la CTCF de los ovocitos teñidos con LCA-FITC. Estos ovocitos presentaban su ZP para retener el cuerpo polar y poder asociar la morfología de este con la disposición de los GC. Una muestra de las fotografías que se obtuvieron a partir de microscopía confocal se puede observar a continuación en la Figura N° 14.

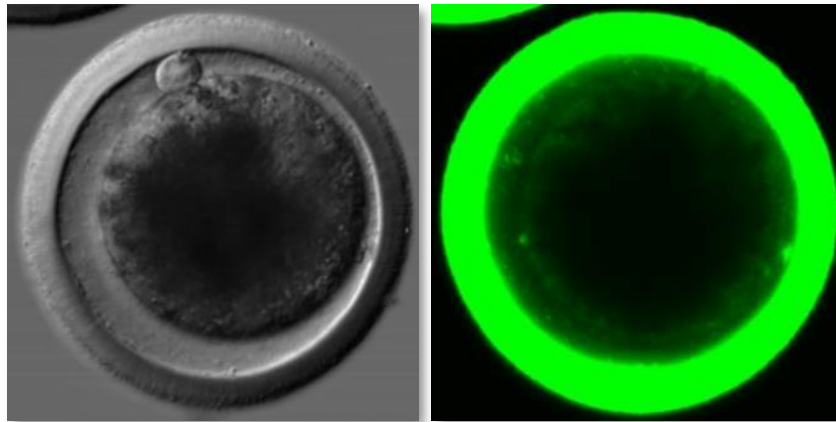


Figura N° 14. Microfotografías en microscopio confocal de ovocitos maduros teñidos con LCA-FITC mediante el protocolo con zona pelúcida. Imagen izquierda: campo claro. Imagen derecha: fluorescencia.

Como puede visualizarse, la metodología tomada de Hu y col. (2014) para teñir ovocitos con ZP no fue óptima ya que el colorante quedó retenido en la ZP, no pudiendo ingresar la suficiente cantidad para teñir los GC.

Debido a este inconveniente, se optó por la metodología de Hosoe y Shioya (1997), quienes evaluaron la disposición de los GC de ovocitos sin ZP. Para ello, previamente se realizó una selección de los ovocitos con extrusión del primer cuerpo polar, y una separación de estos según su morfología. Posteriormente se pudo degradar enzimáticamente la ZP y realizarse la tinción.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de estos resultados obtenidos.

Tabla N° 14. Resumen de los diferentes patrones de distribución de gránulos corticales (GC) según la morfología del primer cuerpo polar (CP).

| Grado de CP | Tipo de disposición de GC |
|------------------------|---------------------------|
| A (fragmentado) | Tipo 1 |
| B (intacto) | Tipo 2 |
| C (rugoso) | Tipo 3 |

La totalidad de los ovocitos maduros con CP grado B (intacto) presentaron un patrón de distribución de los GC de Tipo 2, ya que estas estructuras se encontraron distribuidas en la periferia del ooplasma y formando un halo fluorescente alrededor de la membrana plasmática. En cuanto a los ovocitos con CP rugoso (grado C), presentaron sus GC

distribuidos parcialmente en la membrana plasmática y en el citoplasma (Tipo 3). Finalmente, en los ovocitos con CP fragmentado (grado A), los GC se dispusieron en el citoplasma del ovocito, pero no en membrana plasmática (Tipo 1).

En la Figura N° 15 pueden observarse las fotografías de la microscopía confocal realizada y la correcta tinción de los GC.

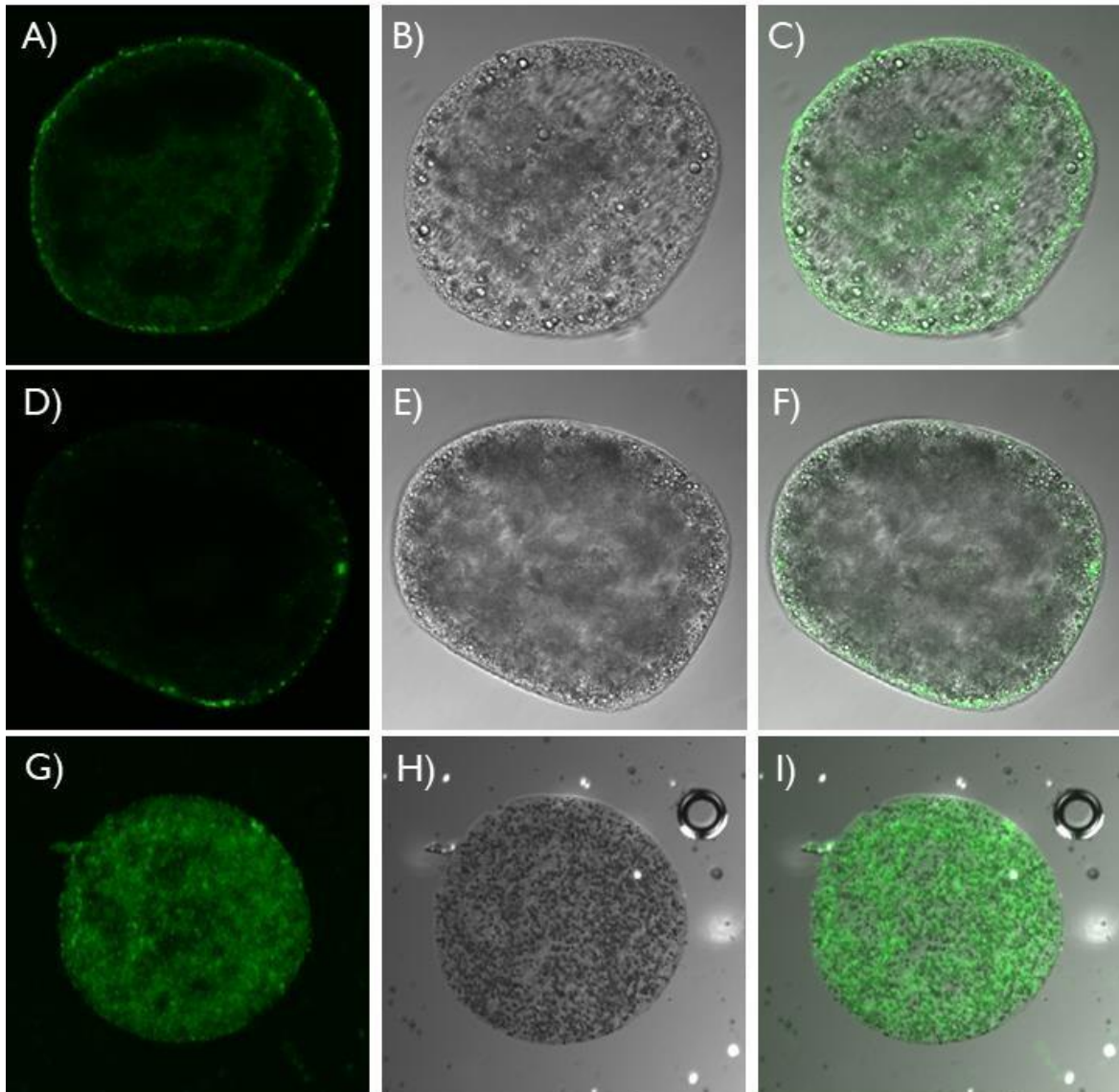


Figura N° 15. Microfotografías en microscopio confocal de ovocitos maduros teñidos con LCA-FITC según el grado de CP sin ZP. **A)** Ovocito con CP intacto con fluorescencia. **B)** Ovocito con CP intacto campo claro. **C)** Superposición entre A y B. **D)** Ovocito con CP rugoso con fluorescencia. **E)** Ovocito con CP rugoso campo claro. **F)** Superposición entre D y E. **G)** Ovocito con CP fragmentado con fluorescencia. **H)** Ovocito con CP fragmentado campo claro. **I)** Superposición entre G y H.

Según estudios realizados en ovocitos maduros en bovinos (Hosoe y Shioya, 1997) y

porcinos (Hu y col., 2011) el posicionamiento de GC debajo de la membrana citoplasmática y formando un halo fluorescente, el patrón de distribución tipo 2, es indicativo de una correcta maduración citoplasmática. Es decir que los ovocitos con CP intacto (grado B) serían los que, además de presentar mayor viabilidad y menor producción de ERO respecto de los ovocitos con CP rugoso o fragmentado, se encuentran completamente maduros (nuclear y citoplasmáticamente).

En una investigación realizada en porcinos, se compararon diversos grados de CP con diferentes categorías de ovocitos según la distribución de GC en el ooplasma, al igual que en el presente trabajo realizado en bovinos. Sus resultados arrojaron el mismo patrón: los ovocitos con CP grado B presentaron una distribución de GC indicativa de maduración citoplasmática completa. Además, analizaron la relación de la morfología del primer CP con el clivaje, el desarrollo embrionario y el nivel de acetilación de los embriones (Hu y col., 2014). Sobre la base de sus resultados, concluyeron que la selección de los ovocitos según esta característica permite obtener ovocitos más competentes y por ende se mejora el desarrollo embrionario *in vitro*.

Con los resultados obtenidos a partir de las diferentes caracterizaciones de ovarios, COCs, ovocitos recién aspirados desde folículos y ovocitos madurados *in vitro* puede deducirse la importancia de realizar este tipo de estudio de las muestras para optimizar el posterior trabajo con técnicas reproductivas y mejorar la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones.

5.3. Desarrollo de un sistema transgénico en células bovinas, basado en el transposón *Sleeping Beauty*, para mediar la integración genómica de secuencias que codifican la enzima heteróloga mFAT2.

5.3.1. Curva de selección de antibióticos.

La concentración de trabajo del antibiótico G418 encontrada para realizar los posteriores ensayos de transfección y selección de células MAC-T conteniendo la correcta inserción de la desaturasa fue de 750 µg/mL.

5.3.2. Transfección de MAC-T, selección y expansión.

Las co-transfecciones del sistema *Sleeping Beauty* se llevaron a cabo según el diseño

experimental descrito en la sección Materiales y Métodos. Pasadas las 48 horas de cultivo de las células tratadas, se confirmó que las transfecciones fueron exitosas, en primera instancia, mediante la observación de la expresión de la proteína Venus (Figura N° 16), bajo microscopio de fluorescencia. Luego, se pasaron las células de los pocillos a placas de 100 mm de diámetro para comenzar el proceso de selección con el antibiótico G418, a una concentración de 750 µg/mL. De esta manera, las colonias que lograron resistir a la acción del antibiótico y que permanecieron fluorescentes, fueron las que lograron insertar correctamente los transposones del sistema SB. Para la expansión clonal, se recuperaron 2 colonias individuales de las placas de 100 mm utilizando anillos de clonación. Se continuó con este proceso durante el tiempo necesario para llegar a confluencia de cada línea monoclonal en frascos de 75 cm³.

La transferencia génica mediada por transposones representa una de las tecnologías de transgénesis activa más eficientes, la cual permite, a través de un mecanismo enzimático, inducir modificaciones genéticas de manera más precisa que las técnicas convencionales, donde el transgén es incorporado al azar en sitios donde se producen rupturas espontáneas en la doble hebra del ADN (Bosch y col., 2015). Uno de los sistemas de transposones más utilizados para la transgénesis en mamíferos es el *Sleeping Beauty* (Garrels y col., 2016).

La efectividad de la transposasa SB en células y embriones ha sido demostrada en diferentes especies de mamíferos (Garrels y col., 2011; Ivics y col., 2014; Kowarz, Löscher y Marschalek, 2015; Garrels y col., 2016). Durante el presente trabajo se observó que el sistema de transgénesis activa basado en el transposón SB fue capaz de modificar eficientemente el genoma de células bovinas en cultivo.

En éste reporte, se realizaron co-transfecciones a una línea celular (MAC-T) con plásmido portador del gen de la enzima transposasa hiperactiva SB100X, junto a dos transposones portadores de casetes para la expresión de la proteína fluorescente Venus (como reportero) y de la desaturasa mFAT-2 (con resistencia a G418). Todas las colonias resistentes al antibiótico (con genotipo FAT-2+) y examinadas bajo la luz UV del microscopio expresaban la proteína reportera. Este primer indicio fenotípico refleja la habilidad de la transposasa SB para transponer simultáneamente transgenes provistos en plásmidos donantes separados (multiplex). Dicha característica puede resultar muy práctica cuando el objetivo es obtener animales bitransgénicos (Alessio y col., 2016).

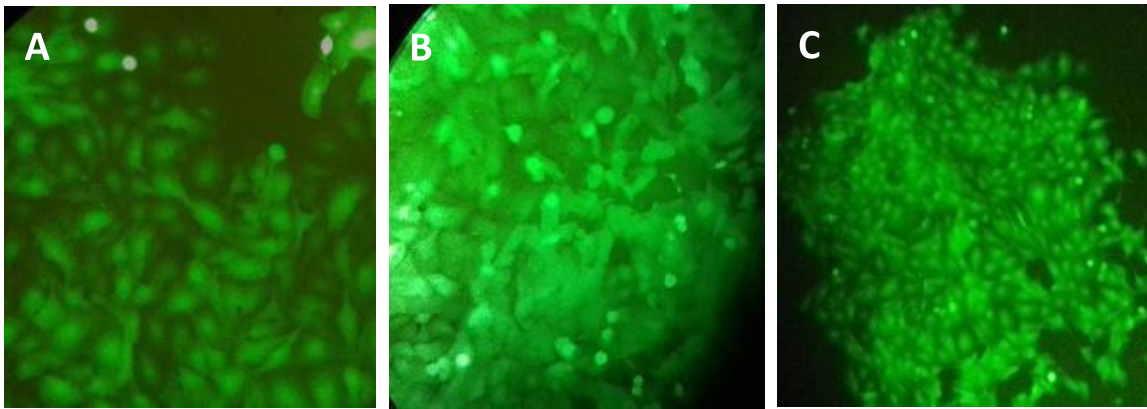


Figura N° 16. Microfotografías de colonias monoclonales de MAC-T transfectadas con los plásmidos del sistema SB (A, B y C), previo a la expansión de cada una de ellas.

En la Figura N° 16 se pueden observar tres microfotografías de diferentes colonias, expresando la proteína verde fluorescente, luego de los 21 días de selección con antibiótico. Esto nos indica que las co-transfecciones se realizaron con éxito, ya que, por un lado, la expresión de Venus nos indica que la secuencia que la codifica se insertó correctamente en el genoma de las colonias de MAC-T. Por otro lado, la selección con G418 sugiere que la secuencia que codifica para mFAT-2 también fue insertada al genoma, debido a que, tanto la secuencia de resistencia a antibiótico como *fat-2* se encontraban en el mismo plásmido y flanqueadas por los ITR.

5.3.3. Confirmación de la presencia del transgén *fat-2* en el genoma bovino mediante PCR.

Luego de obtener colonias monoclonales transgénicas expandidas, se procedió con la extracción de ADN genómico de 2 líneas de MAC-T con fenotipo Venus+/FAT-2+, para confirmar la inserción de las secuencias *fat-2* por PCR. También se realizó éste proceso para un cultivo de MAC-T sin transfectar para utilizarlas de control negativo. Se visualizó la correcta extracción por corrida electroforética de las muestras de ADN en gel de agarosa.

En la Figura N° 17A se pueden observar bandas bien definidas en las 3 calles, donde **1** corresponde a ADN de MAC-T *wild type* y **2** y **3** a ADN de las 2 líneas transgénicas. La presencia de este tipo de bandas, y la ausencia de bandas difusas (“chorreado”), evidencian la integridad del ADN genómico.

Posteriormente, se realizó PCR de las 3 muestras de ADN genómico mencionadas. En Figura N° 17B se visualizan las corridas electroforéticas de los productos de amplificación de PCR. La calle identificada como **WT** corresponde al control negativo (ADN genómico de MAC-T sin transfectar). En la calle **1'** se sembró el control positivo (plásmido pT2-CAGG-FAT2-Neo amplificado). En las calles **2'** y **3'** se sembraron las muestras de ADN de las 2 líneas de células co-transfectadas amplificadas por PCR (posteriormente llamadas M1 y M2).

Como se puede observar, la ausencia de una banda en la calle WT indica que no hubo producto de amplificación del genoma de las células MAC-T sin transfectar.

Por otro lado, en la calle correspondiente al control positivo, aparece una banda, lo que permitió corroborar el correcto diseño de los *primers* ya que se logró amplificar la secuencia *fat-2*.

Por último, en las calles **2'** y **3'** también se visualizan bandas de productos de PCR amplificados. Esto indica que genóticamente se puede confirmar que la desaturasa se encuentra inserta en el genoma bovino de las células MAC-T transgénicas; por el otro lado, se puede asegurar que los cebadores diseñados son específicos de la secuencia de interés.

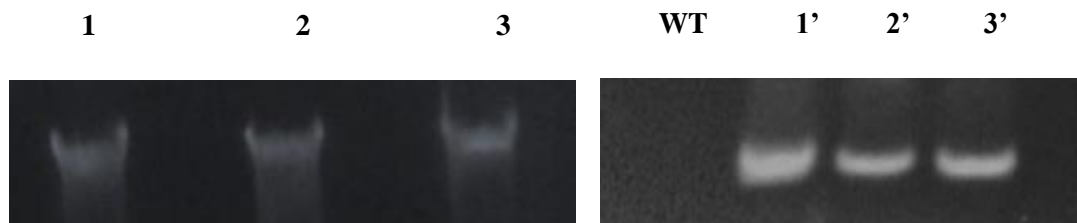


Figura N° 17. Corrida electroforética para visualizar integridad del ADN genómico de las muestras y PCR con cebadores específicos de mFAT-2. A la izquierda: bandas de ADN genómico íntegras luego del proceso de extracción (**1**, **2** y **3**). A la derecha: bandas de corrida electroforética posterior a la PCR con primers específicos de la secuencia del gen de mFAT-2; **WT** (*wild type*) MAC-T sin transfectar; **1'** control positivo; **2'** y **3'** bandas de productos de amplificación de PCR de diferentes líneas monoclonales transfectadas.

Los resultados de las corridas electroforéticas de los productos de amplificación de PCR, con cebadores específicos de la secuencia *fat-2*, fueron concordantes con el fenotipo observado (FAT-2+/Venus+) en las líneas monoclonales desarrolladas. Esto quiere decir que la secuencia que codifica la enzima desaturasa exógena fue amplificada y detectada por dicho procedimiento y, por lo tanto, incorporada al genoma de las células en cuestión. La expresión de estos genes dio como resultado proteínas funcionales, por lo que se puede inferir que las

secuencias insertadas se localizaron en regiones intrónicas o en zonas codificantes donde no se ve afectada la viabilidad de los cultivos. Esto ha sido demostrado en trabajos donde se utiliza el sistema transposon SB, y donde se concluye que las unidades de expresión introducidas por transposición son menos propensas al silenciamiento epigenético porque muestran una expresión a largo plazo del transgén, lo que indicaría que los transposones tienen una tendencia a insertarse en regiones genómicas que son transcripcionalmente permisivas (Yant y col., 2005; Ikeda y col., 2007; Turchiano y col., 2014; Alessio y col., 2016). Cabe aclarar que la optimización y caracterización molecular de SB ya ha sido realizada por el grupo de investigación (Alessio y col., 2016).

5.3.4. Análisis del perfil de ácidos grasos por Cromatografía Gaseosa para estudiar la funcionalidad de la enzima desaturasa mFAT-2.

El objetivo de este experimento fue comprobar si el producto del gen que se logró insertar en el genoma de las células bovinas MAC-T por transfección era funcional.

Debido a que dicha secuencia codifica para una enzima con actividad desaturasa ω -6 / ω -3 es que se realizó Cromatografía de gases para analizar la presencia de dichos AG en los cultivos transgénicos. Los resultados obtenidos a partir de la cromatografía gaseosa son los registrados en la **Tabla N° 15** y la **Figura N° 18**.

Tabla N° 15. Perfil de ácidos grasos (AG) por cromatografía gaseosa.

| Identificación | Tiempo de retención (min) | Porcentaje relativo | | |
|----------------|---------------------------|---------------------|-------------|-------------|
| | | WT | M1 | M2 |
| C11:0 | 3,41 | 0,00 | 0,00 | 1,17 |
| C12:0 | 4,06 | 0,98 | 0,00 | 2,50 |
| C14:0 | 6,54 | 1,74 | 1,81 | 5,47 |
| C15:0 | 8,16 | 2,32 | 0,00 | 9,45 |
| C16:0 | 10,38 | 31,22 | 31,46 | 40,99 |
| C16:1 | 10,75 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C18:0 | 15,68 | 57,32 | 64,36 | 21,04 |
| C18:1 | 16,21 | 6,43 | 1,85 | 17,04 |
| C18:2 | 17,47 | 0,00 | 0,52 | 2,34 |
| C18:3 | 19,36 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Las siglas descriptas en la columna identificación hacen referencia a la cantidad de carbonos (C) de los ácidos grasos identificados, seguido del número de insaturaciones. Los valores resaltados de la fila C18:2 muestran las diferencias entre las células transfectadas (M1 y M2) y el control negativo (WT).

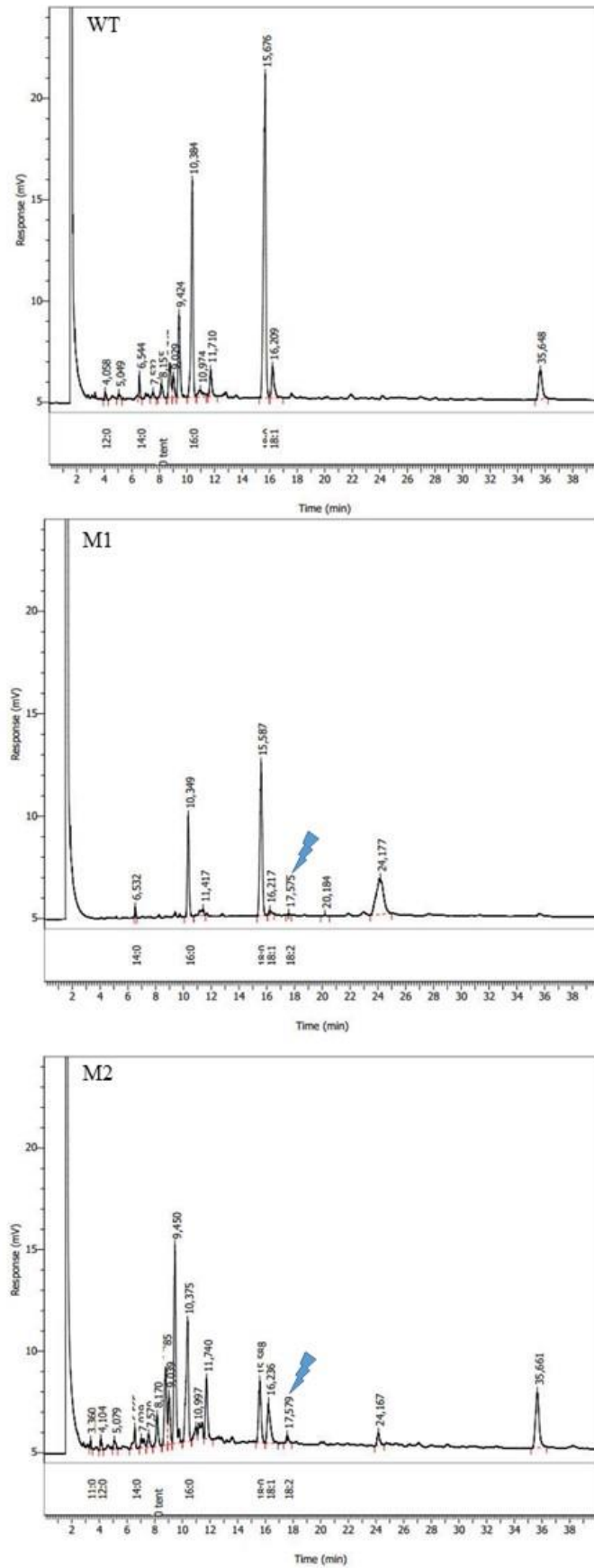


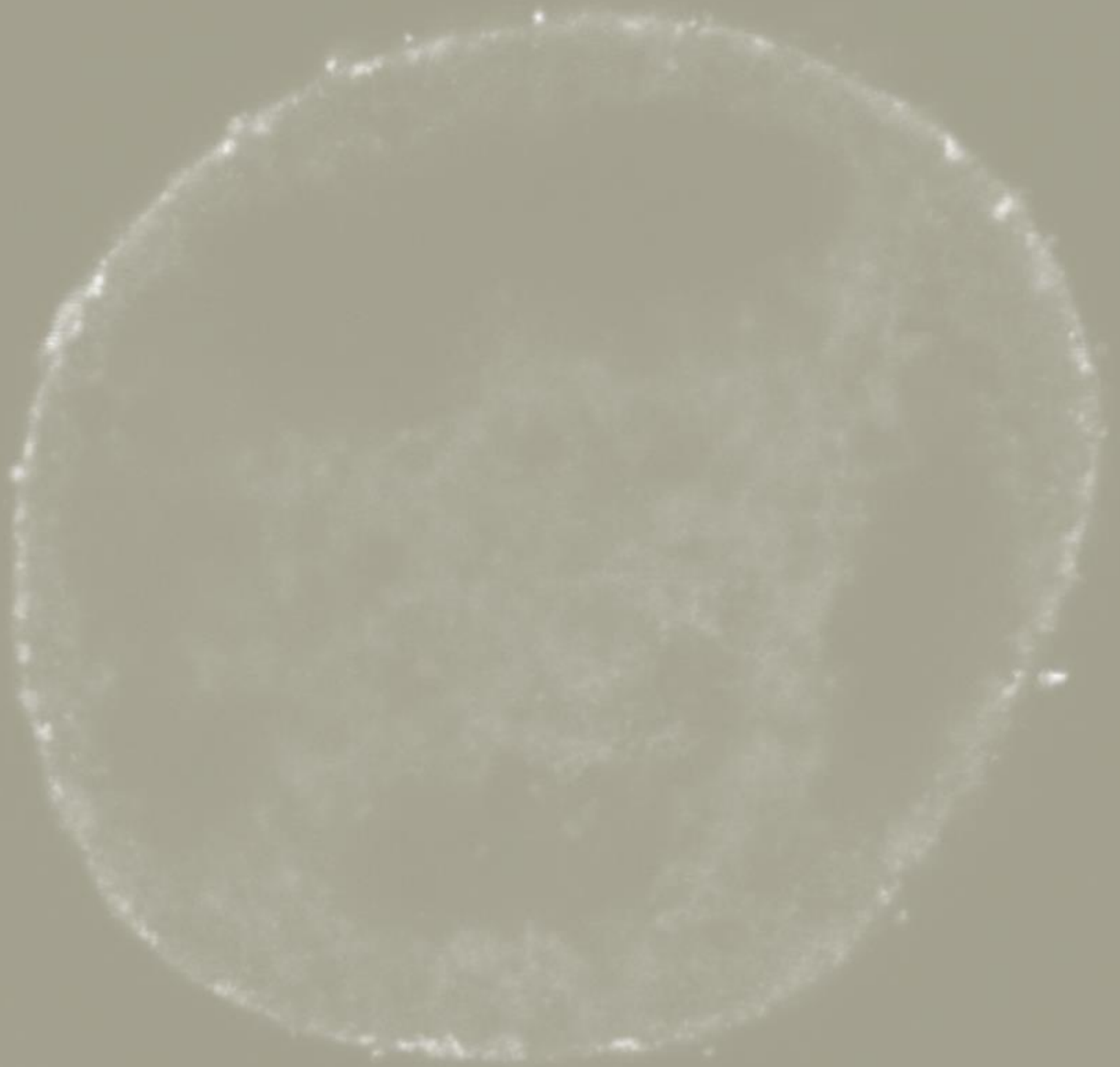
Figura N° 18. Cromatogramas donde se observa la aparición de los picos de los diferentes ácidos grasos (AG) según el tiempo de retención de cada uno.

Los resultados obtenidos mediante cromatografía de gases mostraron ausencia de AG poliinsaturados en la muestra sin transfectar (WT) y presencia de ellos en las muestras transgénicas (M1 y M2).

Esto se debe, por un lado, a que los mamíferos tienen la capacidad de sintetizar AG monoinsaturados por medio de la enzima esteroil-(CoA)-desaturasa, pero son incapaces de realizar poliinsaturaciones, ya que carecen de la enzima necesaria (Peyou-Ndi y col., 2000; Blanco, 2011).

Por otro lado, la enzima recombinante expresada en las células tiene la capacidad de realizar insaturaciones $\Delta 12$ y $\Delta 15$, es decir que funcionaría como una desaturasa bifuncional. Si bien no se detectaron AG omega-3, los AG omega-6 encontrados dan la pauta de que la enzima está funcionando, ya que de otra manera sería imposible hallarlos en cultivos de células de vertebrados. Como se ha demostrado (Zhou y col., 2011), CeFAT-2 presenta una gran versatilidad con respecto a la longitud de la cadena de AG (desde 14 átomos de carbono hasta 18) que puede utilizar como sustrato para producir lípidos poliinsaturados.

CONCLUSIONES



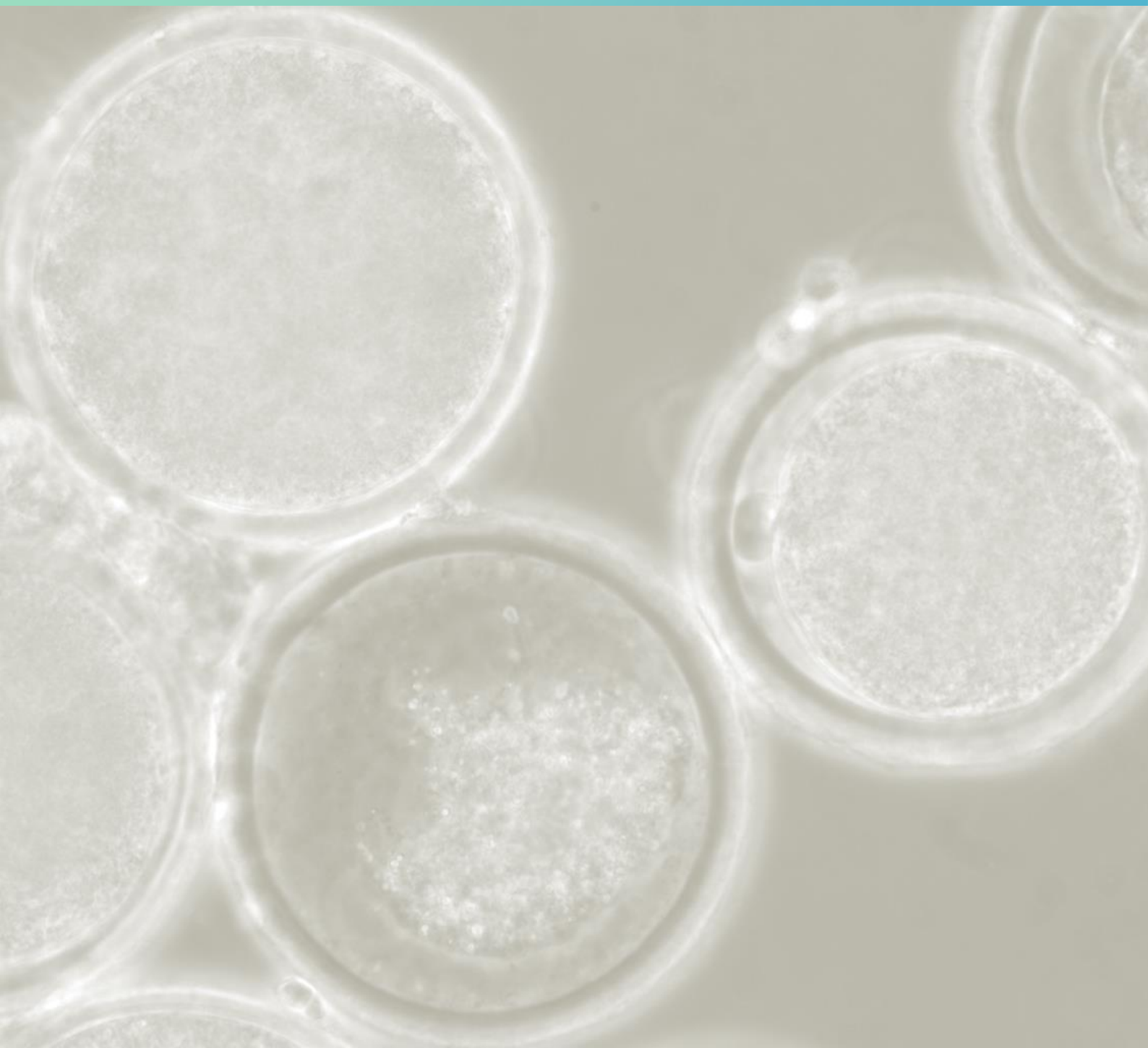
6. CONCLUSIONES

- Se logró caracterizar morfológicamente ovarios obtenidos a partir de hembras bovinas faenadas sobre la base de las estructuras presentes (folículos ováricos y CL) como así también se caracterizaron los COCs obtenidos a partir de folículos antrales por aspiración.
- Los ovarios que prevalecieron en las muestras fueron los que presentan tanto CL como FD respecto de los que presentan sólo una o ninguna de dichas estructuras.
- La mayoría de los COCs y ovocitos aspirados a partir de ovarios de hembras bovinas faenadas resultaron ser de buena calidad en cuanto a las determinaciones morfológicas y funcionales realizadas en este trabajo. La abundancia de COCs y ovocitos de buena calidad abre oportunidades para el potencial uso de estos en tecnologías reproductivas *in vitro*.
- Se determinó que los ovocitos maduros bovinos se pueden clasificar de acuerdo a la morfología del primer cuerpo polar (CP) en ovocitos grado A (con primer CP fragmentado), ovocitos grado B (con primer CP intacto) y ovocitos grado C (con primer CP rugoso).
- Los ovocitos que predominaron fueron aquellos que presentaron su primer cuerpo polar con morfología intacta (grado B), respecto de los ovocitos de grado A o C.
- Se demostró que los ovocitos bovinos con cuerpos polares CP intactos (grado B) presentaron una mejor calidad respecto de los ovocitos con CP fragmentado (grado A) ya que resultaron 100 % viables y presentaron niveles de especies reactivas del oxígeno menores a las producidas por los ovocitos con CP fragmentado o rugoso.
- Se logró poner a punto la metodología utilizada para evaluar la disposición de los gránulos corticales en los ovocitos maduros según la morfología del primer CP.
- Los ovocitos con primer CP de morfología intacta resultaron ser los que poseen una maduración completa ya que presentan sus GC distribuidos en la periferia, formando un halo fluorescente por debajo de la membrana plasmática del ovocito, disposición indicativa de una correcta maduración citoplasmática.
- La morfología del primer cuerpo polar es un método relativamente sencillo y no invasivo que permite seleccionar ovocitos maduros bovinos de calidad, lo que resultaría en una mayor probabilidad de promover el desarrollo embrionario.
- Fue posible modificar eficientemente el genoma de células bovinas en cultivo por medio del sistema de transgénesis activa basado en el transposón *SB*.
- La expresión del transgén de la desaturasa mFAT2 insertado por transposición en las

células bovinas resultó ser funcional, ya que se pudo demostrar, mediante cromatografía gaseosa, un cambio en el perfil lipídico con presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Dicho perfil lipídico sólo puede explicarse por la expresión en las células transgénicas de la desaturasa mFAT2.

- Dichas células modificadas podrían ser empleadas en experimentos de clonado por TNCS para la generación de vacas transgénicas que expresen la desaturasa FAT-2 en la glándula mamaria. Esto mejoraría la proporción de ácidos grasos poliinsaturados en la leche que producen las hembras bovinas, y, por ende, incrementaría la incorporación de AG esenciales en la dieta de la especie humana.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. In *Animals* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–24). MDPI AG.
- Alessio, A. P., Fili, A. E., Garrels, W., Forcato, D. O., Olmos Nicotra, M. F., Liaudat, A. C., Bevacqua, R. J., Savy, V., Hiriart, M. I., Talluri, T. R., Owens, J. B., Ivics, Z., Salamone, D. F., Moisyadi, S., Kues, W. A., & Bosch, P. (2016). Establishment of cell-based transposon-mediated transgenesis in cattle. *Theriogenology*, 85(7), 1297- 1311.e2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.016>
- Arlotto, T., Schwartz, J., First, N. L., & Leibfried-Rutledge, M. L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45, 943–956.
- Balakier, H., Sojecki, A., Motamedi, G., Bashar, S., Mandel, R., & Librach, C. (2012). Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertility and Sterility*, 98(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.015>
- Bertolini, Meade, Lazzarotto, Martins, Tavares, Bertolini, Murray. (2016). The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, 25(3), 329–343. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9933-9>
- Bertuola Marcos. (2019). Interacción de los materiales biofuncionales y/o bioactivos con los medios biológicos. <https://doi.org/10.35537/10915/72932>
- Blanco, A. (2011). *Química Biológica de Antonio Blanco - 8va Edición-2011*.
- Bosch, P., Forcato, D. O., Alustiza, F. E., Alessio, A. P., Fili, A. E., Olmos Nicotra, M. F., Liaudat, A. C., Rodríguez, N., Talluri, T. R., & Kues, W. A. (2015). Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(10), 1907–1929. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1842-1>.
- Butler, G. (2014). Manipulating dietary PUFA in animal feed: implications for human health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(1), 87–95. <https://doi.org/10.1017/s0029665113003790>
- Calder, P. C. (2004). n –3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical Science*, 107(1), 1–11. <https://doi.org/10.1042/cs20040119>
- Carlson, Dupuy, A. J., Fritz, S., Roberg-Perez, K. J., Fletcher, C. F., & Largaespada,

- D. A. (2003). Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics*, 165(1), 243–256.
- Carlson, D. F., Garbe, J. R., Tan, W., Martin, M. J., Dobrinsky, J. R., Hackett, P. B., Clark, K. J., & Fahrenkrug, S. C. (2011). Strategies for selection marker-free swinetransgenesis using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Research*, 20(5), 1125–1137. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9481-7>
 - Cavallari, F. D. C., Leal, C. L. V., Zvi, R., & Hansen, P. J. (2019). Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during in vitro maturation. *Zygote*, 27(3), 180–186. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000236>
 - Cheuquemán, C., Loren, P., Arias, M., Risopatrón, J., Felmer, R., Álvarez, J., Mogas, T., & Sánchez, R. (2015). Effects of short-term exposure of mature oocytes to sodium nitroprusside on in vitro embryo production and gene expression in bovine. *Theriogenology*, 84(8), 1431–1437. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.031>
 - Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2018). InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>.
 - Dupuy, A. J., Akagi, K., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (2005). Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature*, 436(7048), 221–226. <https://doi.org/10.1038/nature03691>
 - Ebner, T., Moser, M., Yaman, C., Feichtinger, O., Hartl, J., & Tews, G. (1999). Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. In *in vitro fertilization fertility and sterility* (Vol. 72, Issue 4).-Hansen Laboratory, P. J. (2017). *In Vitro Production of Bovine Embryos*.
 - Forcato, D. O., Fili, A. E., Alustiza, F. E., Lázaro Martínez, J. M., Bongiovanni Abel, S., Olmos Nicotra, M. F., ... Bosch, P. (2017). Transfection of bovine fetal fibroblast with polyethylenimine (PEI) nanoparticles: effect of particle size and presence of fetal bovine serum on transgene delivery and cytotoxicity. *Cytotechnology*, 69(4), 655–665. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0075-6>
 - Garrels, W., Mátés, L., Holler, S., Dalda, A., Taylor, U., Petersen, B., Niemann, H., Izsvák, Z., Ivics, Z., & Kues, W. A. (2011). Germline transgenic pigs by Sleeping beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PLoS ONE*,

- 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023573>
- Garrels, W., Talluri, T. R., Apfelbaum, R., Carratalá, Y. P., Bosch, P., Pötzsch, K., ... Kues, W. A. (2016). One-step multiplex transgenesis via sleeping beauty transposition in cattle. *Scientific Reports*, 6(February), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep21953>
 - Garrels, W., Talluri, T. R., Ziegler, M., Most, I., Forcato, D. O., Schmeer, M., ... Kues, W. A. (2016). Cytoplasmic injection of murine zygotes with Sleeping Beauty transposon plasmids and minicircles results in the efficient generation of germline transgenic mice. *Biotechnology Journal*, 11(1), 178–184. <https://doi.org/10.1002/biot.201500218>
 - Goszczynski DE, Cheng H, Demyda-Peyrás S, Medrano JF, Wu J, & Ross PJ. (2019). In vitro breeding: application of embryonic stem cells to animal production. *Biology of Reproduction*, 100(4), 885–895.
 - Guivemau, M., Meza, N., Roman, O., & Barja, P. (1994). *Clinical and Experimental Study on the Long-term Effect of Dietary. December 1993.*
 - Hajarian, H., Shahsavari, M. H., Karami-shabankareh, H., & Dashtizad, M. (2016). The presence of corpus luteum may have a negative impact on in vitro developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, 16(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.007>
 - Hansen Laboratory, P. J. (2017). *In Vitro Production of Bovine Embryos.*
 - Heredia, R. M., Boeris, P. S., Biasutti, M. A., López, G. A., Paulucci, N. S., & Lucchesi, G. I. (2014). Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, 2618–2626. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081943-0>
 - Hibbeln, J. R. (1998). Fish consumption and major depression. *The Lancet*, 351, 1213–1214.
 - Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Kabermann, A., Brem, G., Wolf, E., & Pfeifer, A. (2006). Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Molecular Therapy*, 13(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.685>
 - Hosoe, M., & Shioya, Y. (1997). Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. In *Zygote* (Vol. 5).
 - Hu, J., Jin, C., Zheng, H., Liu, Q., Zhu, W., Zeng, Z., Wu, J., Wang, Y., Li, J., Zhang, X., Liu, X., & Zhao, J. (2014). First polar body morphology affects potential development of porcine parthenogenetic embryo in vitro. *Zygote*, 31(1), 615–621. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000252>

- Hu, J., Ma, X., Bao, J. C., Li, W., Cheng, D., Gao, Z., Lei, A., Yang, C., & Wang, H. (2011). Insulin-transferrin-selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes in vitro. *Zygote*, 19(3), 191–197. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000663>
- Huang, X., Wilber, A. C., Bao, L., Tuong, D., Tolar, J., Orchard, P. J., ... Zhou, X. (2006). Stable gene transfer and expression in human primary T cells by the. *Gene*, 107(2), 483–491. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2133>. Supported
- Huynh, H. T., Robitaille, G., & Turner, J. D. (1991). Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An in vitro model for bovine lactation. *Experimental Cell Research*, 197(2), 191–199. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90422-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90422-Q)
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32.
- Ihazeleper N L, Hill DJ, Stubbings RB, & Walton JS. (1994). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 43,19, 509–522.
- Ikeda, R., Kokubu, C., Yusa, K., Keng, V. W., Horie, K., & Takeda, J. (2007). Sleeping Beauty Transposase Has an Affinity for Heterochromatin Conformation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5), 1665–1676. <https://doi.org/10.1128/mcb.01500-06>
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., & Izsvák, Z. (1997). Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91(4), 501–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
- Ivics, Z., Mátés, L., Yau, T. Y., Rüllicke, T., Landa, V., Zidek, V., ... Geurts, A. (2014). Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nature Protocols*, 9(4), 773–793. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.008>
- Jiao, Z. X., Xu, M., & Woodruff, T. K. (2012). Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies: Potential markers of oocyte competence. *Fertility and Sterility*, 98(2), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.035>
- Kahn-Kirby A. H., Dantzer J. M., Apicella A. J., Schafer W. R., Browse J., Bargmann C. I., Watts J. L. (2004). Specific Polyunsaturated Fatty Acids Drive TRPV- Dependent Sensory Signaling In Vivo. *Cell*, Vol.119,889–900
- Kao, B. T., Lewis, K. A., DePeters, E. J., & Van Eenennaam, A. L. (2006). Endogenous Production and Elevated Levels of Long-Chain n-3 Fatty Acids in the Milk of Transgenic Mice. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 3195–3201. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72594-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72594-2)
- Karami Shabankareh, H., Hamed Shahsavari, M., Hajarian, H., & Moghaddam, G.

- (2015). In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. In *Iran J Reprod Med* (Vol. 13, Issue 10).
- Kobayashi, K., Yamashita, S., & Hoshi, H. (1994). Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on in vitro maturation of cumulus cell- enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 439–446.
 - Kowarz, E., Löscher, D., & Marschalek, R. (2015). Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnology Journal*, 10(4), 647–653. <https://doi.org/10.1002/biot.201400821>
 - Kues, W. A., & Niemann, H. (2004). *The contribution of farm animals to human health*. 22(6). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.003>
 - Lai, Liangxue., Kang, J. X., Li, Rongfeng., Wang, Jingdong., Witt, W. T., Yong, H. Yul., Hao, Yanhong., Wax, D. M., Murphy, C. N., Rieke, August., Samuel, Melissa., Linville, M. L., Korte, S. W., Evans, R. W., Starzl, T. E., Randall, S. Prather., & Dai, Yifan. (2006). Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
 - Lanier, S. J., & Corl, B. A. (2015). Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0025-0>
 - Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, 48(No. 1). <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/48/1/76/4697795>
 - Lemaitre, R. N., Mozaffarian, D., Siscovick, D. S., King, I. B., Kuller, L. H., & Tracy, R. P. (2003). n-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: The Cardiovascular Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 319–325. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.2.319>
 - Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4:255-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
 - McClintock, B. (1950). Studies on the Mechanism of the Oxygen Effect on the Radiosensitivity of Tradescantia Chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(6), 337–344. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.337>
 - Madison, V., Avery, B., & Greve, T. (1992). Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 27).
 - Manjunatha, B. M., Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., Devaraj, M., Ramesh, H. S., & Nandi,

- S. (2007). In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 68(6), 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.07.001>
- Mantegazza, R., Cordiglieri, C., Consonni, A., & Baggi, F. (2016). Animal models of myasthenia gravis: Utility and limitations. *International Journal of General Medicine*, 9, 53–64. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S88552>
 - Marik, P. E., & Varon, J. (2009). Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: A systematic review. *Clinical Cardiology*, 32(7), 365–372. <https://doi.org/10.1002/clc.20604>
 - McWhir, J. (2002). *Biomedical and Agricultural Applications of Animal Transgenesis*. 180, 3–23.
 - Moss, J. I., Pontes, E., & Hansen, P. J. (2009). Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. *Archives of Toxicology*, 83(11), 1001–1007. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0458-3>
 - Nagano, M. (2018a). *Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes*.
 - Nagano, M. (2018b). *Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes*.
 - Nagano, M., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2006). Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, 14(1), 53–61. <https://doi.org/10.1017/S0967199406003510>
 - Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Polejaeva, I. A., & Chen, C. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>
 - Norgren. (2004). *Creation of non-human primate neurogenetic disease models by gene targeting and nuclear transfer*. 1, 6–9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-40>
 - Otoil T., Yamamotol K., Koyamal N., Tachikawal S., & Suzuki T. (1997). BOVINE OODIAMETER IN RELATION TO DEWXOPMENTAL COMPETENCE. *Theriogenology* H&769-774.
 - Pavani, K. C., Rocha, A., Oliveira, E., da Silva, F. M., & Sousa, M. (2020). Novel ultrastructural findings in bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 143, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.003>
 - Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and Developmental Competence of Bovine Oocytes Derived From Different Categories of Antral Follicles.

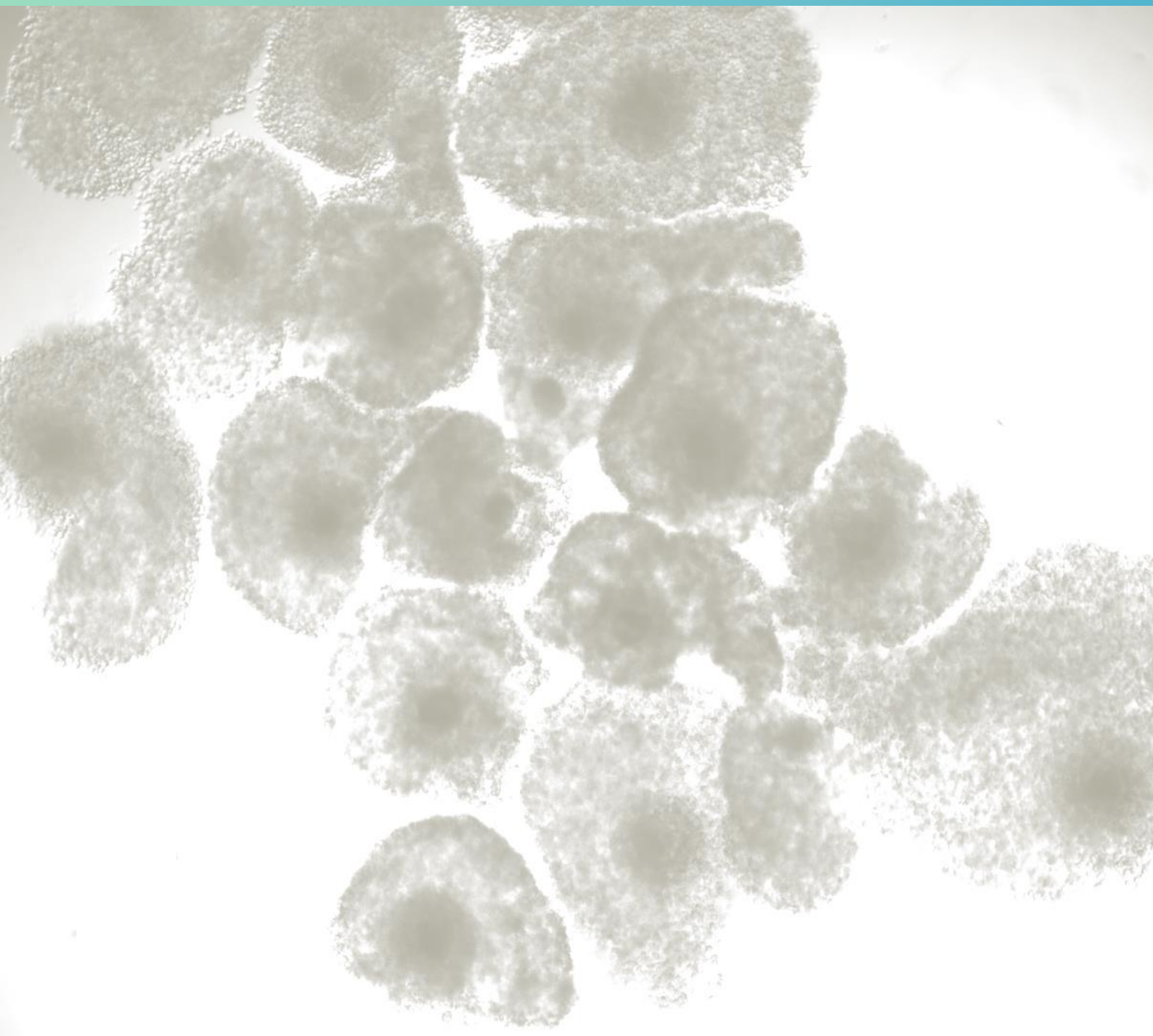
Molecular reproduction and development , 31:6347.

- Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., Ding, C., Qin, J., Liu, L., Wang, W., Liu, J., Huang, X., & Wei, H. (2015). Production of Human Albumin in Pigs Through CRISPR / Cas9- Mediated Knockin of Human cDNA into Swine Albumin Locus in the Zygotes. Nature Publishing Group, November, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep16705>.
- Peyou-Ndi, M. M., Watts, J. L., & Browse, J. (2000). Identification and Characterization of an Animal ω 12 Fatty Acid Desaturase Gene by Heterologous Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. 376(2), 399–408. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1733>
- Rodríguez Telles, B. E., Barrio Molina, J., Villamediana Monreal P. C. (2004). Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. CIENCIA 12 (2), 125 – 136.
- Rogers, C. S. (2016). Genetically engineered livestock for biomedical models. *Transgenic Research*, 25(3), 345–359. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9928-6>
- Rose, B. I., & Laky, D. (2013). Polar body fragmentation in IVM oocytes is associated with impaired fertilization and embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(5), 679–682. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9982-4>
- Roynette, C. E., Calder, P. C., Dupertuis, Y. M., & Pichard, C. (2004). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Colon Cancer Prevention. *Clinical Nutrition*, 23(2), 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2003.07.005>
- Sabikhi, L. (2007). *Designer Milk*. 53(07), 161–198. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(07\)53005-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(07)53005-6)
- Saeki, K., Kano, K., Iritani, A., Hirabayashi, M., Tasaka, Y., Matsumoto, K., Hosoi, Y., Murata, N., Taguchi, Y., Mikami, K., Suzuki, I., Kashiwazaki, N., & Kinoshita, M. (2004). From The Cover: Functional expression of a 12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6361–6366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308111101>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open- source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp.676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

- Shinohara, E. T., Kaminski, J. M., Segal, D. J., Pelczar, P., Kolhe, R., Ryan, T., Coates, C. J., Fraser, M. J., Handler, A. M., Yanagimachi, R., & Moisyadi, S. (2007). Active integration: New strategies for transgenesis. *Transgenic Research*, 16(3), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9077-z>
- Sinzelle, L., Vallin, J., Coen, L., Chesneau, A., Pasquier, D. Du, Pollet, N., ... Mazabraud, A. (2006). Generation of transgenic *Xenopus laevis* using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Research*, 15(6), 751–760. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9014-6>
- Smith L. C. (1993). Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 99, 39-44.
- Stamey Lanier, J. ., Suagee, J. K., Becvar, O., & Corl, B. A. (2013). *Mammary Uptake of Fatty Acids Supplied by Intravenous Triacylglycerol Infusion to Lactating Dairy Cows*. 469–479. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3782-6>
- Takahashi, G., Gurumurthy, C. B., Wada, K., Miura, H., Sato, M., & Ohtsuka, M. (2015). GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: A novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Scientific Reports*, 5(June), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep11406>
- Timlin, C. L., Lynn, A., Wooldridge, L. K., Uh, K., Ealy, A. D., White, R. R., Lee, K., & Mercadante, V. R. G. (2021). Physical parameters of bovine activated oocytes and zygotes as predictors of development success. *Zygote*. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000058>
- Turchiano, G., Latella, M. C., Gogol-Döring, A., Cattoglio, C., Mavilio, F., Izsvák, Z., ... Recchia, A. (2014). Genomic analysis of sleeping beauty transposon integration in human somatic cells. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112712>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012 Aug 1;40(15):e115. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3424584/>
- Varisanga, M. D., Sumantri, C., Murakami, M., Fahrudin, M., & Suzuki, T. (1998). Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for ivf-produced bovine embryos.
- Wu, X., Ouyang, H., Duan, B., Pang, D., & Zhang, L. (2012). Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. 537–543. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9554-2>

- Yant, ., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., Izsvak, Z., & Kay, M. A. (2000). Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nature Genetics*, 25(1), 35–41. <https://doi.org/10.1038/75568>
- Yant, S. R., Wu, X., Huang, Y., Garrison, B., Burgess, S. M., & Kay, M. A. (2005). High-Resolution Genome-Wide Mapping of Transposon Integration in Mammals. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6), 2085–2094. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.6.2085-2094.2005>
- Younis, J. S., Radin, O., Izhaki, I., & Ben-Ami, M. (2009). Does first polar body morphology predict oocyte performance during ICSI treatment? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(11–12), 561–567. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9368-9>
- Yu, S., Luo, J., Song, Z., Ding, F., Dai, Y., & Li, N. (2011). Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Research*, 21(11), 1638–1640. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.153>
- Zayed, H., Izsvák, Z., Walisco, O., & Ivics, Z. (2004). Development of hyperactive Sleeping Beauty transposon vectors by mutational analysis. *Molecular Therapy*, 9(2), 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.11.024>
- Zhang, P., Liu, P., Dou, H., Chen, L., Chen, L., Lin, L., Tan, P., Vajta, G., Gao, J., Du, Y., & Ma, R. Z. (2013). Handmade Cloned Transgenic Sheep Rich in Omega-3 Fatty Acids. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055941>
- Zhang, H., Pan, Z., Ju, J., Xing, C., Li, X., Shan, M., & Sun, S. (2020). DRP1 deficiency induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress-mediated apoptosis during porcine oocyte maturation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00489-4>
- Zhou, X. R., Green, A. G., & Singh, S. P. (2011). Caenorhabditis elegans $\Delta 12$ - desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the $\Delta 12$ and $\Delta 15$ positions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43644–43650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266114>

ANEXOS





CORPUS PUBLISHERS

Corpus Journal of Dairy and Veterinary Science (CJDVS)

ISSN: 2833-0986

Volume 4 Issue 3, 2023

Article Information

Received date : July 13, 2023

Published date: July 27, 2023

*Corresponding author

Pablo Bosch, Department of Molecular Biology-Institute of Environmental Biotechnology and Health (INBIAS), Faculty of Exact, Fco-Qcas and Natural Sciences, National University of Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. National Council for Scientific and Technological Research (CONICET), 5800, Argentina

DOI: 10.54026/CJDVS/1059

Keywords

Cow Oocytes; Bovine Ovaries; Dominant Follicle; Corpus Luteum; Fertilization

Distributed under Creative Commons
CC-BY 4.0

Research Article

Morphological and Functional Characterization of Cow Oocytes for Assisted Reproduction Techniques

Opizzo BA, Liaudat AC, Blois DA, González MA, Rodríguez N and Bosch P*

Department of Molecular Biology - Institute of Environmental Biotechnology and Health (INBIAS), Faculty of Exact, Fco-Qcas and Natural Sciences, National University of Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. National Council for Scientific and Technological Research (CONICET), 5800, Argentina

Abstract

In *in vitro* production of embryos (IVP), oocytes from the ovaries of slaughterhouse animals are commonly used. However, the quality of these oocytes is highly variable due to unknown category and condition of the slaughtered females. As a result, a heterogeneous population of oocytes with varying capacities for maturation and supporting embryonic development is obtained. The aim of this study was to investigate the morphological and biological characteristics of ovaries and oocytes from slaughtered bovines in order to establish selection criteria for oocytes to be used in IVP. To achieve this, the ovaries were categorized based on the presence or absence of structures such as Corpus Luteum (CL), Dominant Follicle (DF), both (CL+DF), or none (NO). The number and diameter of the follicles were also determined and grouped into three categories: <3 mm, 3-8 mm, or >8 mm. The Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) obtained through follicular aspiration were analyzed for several parameters. These included, oocyte coverage by the Cumulus Cells (CC), the number of layers of CC, compaction and thickness of the CC layers. In denuded oocytes, the area, perimeter and diameter of the ooplasm as well as the thickness of the Zona Pellucida (ZP) were measured. Additionally, staining with Hoechst 33342, propidium iodide, or Rhodamine 123 was performed to analyze nuclear and metaphase morphology, cell viability, and mitochondrial functionality, respectively. All these determinations were made on microphotographs captured using a camera attached to an inverted microscope and processed using the Fiji software. Statistical analysis was conducted using ANOVA and Bonferroni's Test. The results revealed a predominance of ovaries with CL+DF, and in terms of follicular size, the <3 mm category exhibited the highest frequency of follicles, followed by the 3-8 mm category. Approximately 87.83±6.51% of the COCs showed complete coverage by CC; with 69.66±7.86% of the CC exhibiting compaction and 21.92±7.86% being slightly relaxed. A correlation was observed between the variable of CC layers and CC diameter (quantitative), with 91.42% of COCs having maximum diameters. Approximately, 83.11±4.27% of the oocytes displayed homogenous ooplasm, with the following measurements: area 12±0.37µm², perimeter 387.5±10µm, diameter 123±1.1µm, and ZP thickness 12.2±0.17µm. Moreover, 97.61± 0.11% of the oocytes were found to be viable, with no alterations observed in nuclear morphology and 100% displayed mitochondrial and metaphase activity. In conclusion, the ovaries and their corresponding COCs obtained from slaughtered females exhibit characteristics indicative of good quality for use in *in vitro* procedures.

Introduction

In vitro embryo production (IVP) has been utilized for both productive and scientific purposes, including the generation of Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) cloned animals, transgenic animals, and embryonic stem cells [1]. The efficiency of IVP in livestock species, as measured by the proportion of immature oocytes reaching the blastocyst stage, rarely exceeds 30-40%. This implies that a significant percentage of oocytes do not develop after maturation [2]. In bovines, one of the reasons for the low development rates of *in vitro* matured oocytes is their degeneration. Since cows are mono-ovulatory, most oocytes used for IVP are prone to degeneration [3]. The quality of oocytes is highly variable, especially considering that the ovaries used in most cases come from slaughterhouses, and the characteristics of their origin (such as the identity or genetic merit of the donor, stage of the estrous cycle, and follicular wave stage) are often unknown [4]. Consequently, it is common to obtain a heterogeneous population of oocytes that possess varying capacities for maturation and early embryonic development after fertilization. This variability is commonly referred to as developmental competence or oocyte quality [2]. To enhance the efficiency of IVP, it is crucial to evaluate the maturation capacity and functional state of oocytes before *In Vitro* Maturation (IVM) [5].

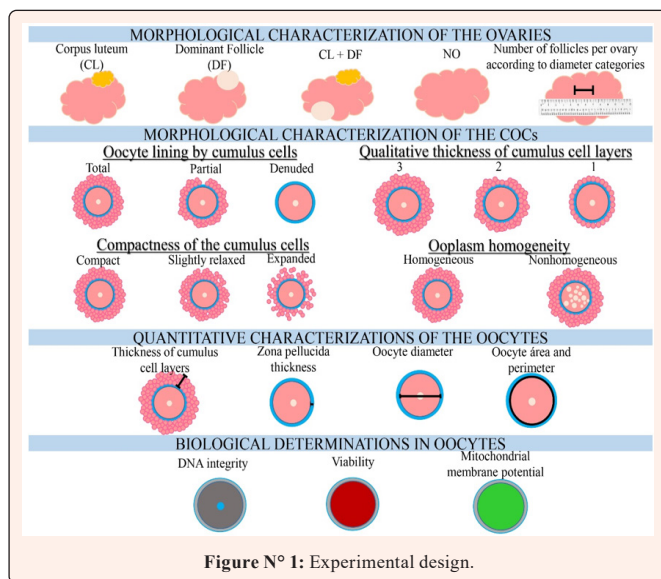
Current evaluation criteria for the selection of oocytes or embryos are based on the number of blastomeres, proportion of apoptotic cells, and genetic and epigenetic studies. However, these techniques are invasive and have endpoint limitations, hindering the continuity of the embryonic development process. More sophisticated procedures, such as qRT-PCR, global transcriptomic analysis, and proteomic analysis, have been explored. Nevertheless, the lack of a rapid method that produces reliable results presents challenges in implementing these technologies [2]. For productive purposes, it is necessary to employ non-invasive methods to assess oocyte competence, such as morphological evaluation [6]. It is widely accepted that oocytes with homogeneous brown or brownish ooplasm, surrounded by a compact shell and multiple layers of cumulus cells, are suitable for IVM [7]. Although morphological evaluation is a useful method, it is inherently subjective, and the results can vary depending on the experience of each technician. Therefore, it is important to incorporate additional quantitative criteria to minimize discrepancies between laboratories [6]. Some determinations rely on measurements of physical parameters that can be easily and quickly assessed using microscopy, such as ooplasm diameter or area [8,9] and ZP diameter [6,10].

Therefore, by characterizing bovine ovaries and oocytes obtained from slaughterhouse animals, we can improve the identification and selection of oocytes with higher chances of development, ultimately leading to an increase in IVP efficiency. Hence, the objective of this study is to characterize bovine ovaries and oocytes based on non-invasive morphological and biological parameters to facilitate future tests for *in vitro* embryo production.

Materials and Methods

Experimental design

The experimental design is summarized in Figure 1. Initially, the morphological characterization of ovaries obtained from a slaughterhouse was conducted, categorizing them based on the presence of different ovarian structures such as corpus luteum, dominant follicle, both structures, or neither. Additionally, the number of follicles per ovary was counted and categorized into three diameter ranges (0-3 mm, 3-8 mm, and >8 mm). The results were obtained from five independent repetitions. For subsequent characterizations, the follicular aspiration technique was utilized to obtain oocytes. The oocytes were then selected using a stereomicroscope and observed and photographed using an inverted microscope coupled with a camera. The Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) were morphologically evaluated based on the presence of cumulus cells, the qualitative thickness of the cumulus cell layers surrounding the oocyte, the compactness of the layers, and the homogeneity of the ooplasm. The results were obtained from four independent repetitions.



For quantitative characterization, the aspirated COCs were treated with hyaluronidase to remove the cumulus cells. From the microphotographs obtained, the following measurements were taken using Fiji software [11]: quantitative thickness of the cumulus cell layers surrounding the oocyte, area, perimeter, and diameter of the oocyte, and thickness of the zona pellucida. Finally, independent staining with Hoechst, Rhodamine 123, and Propidium Iodide were performed on denuded oocytes to assess DNA integrity, mitochondrial membrane potential, and viability, respectively.

Ovary collection: Bovine ovaries were collected from the Coronel Moldes Slaughterhouse (Río Cuarto plant, Río Cuarto, Córdoba, República Argentina), which is situated approximately 10 km from the laboratory. The ovaries were transported in a thermal container at a temperature of around 25 °C. Upon arrival, the ovaries were washed with a 0.9% NaCl solution.

Morphological classification of ovaries: The ovaries were morphologically classified based on the presence or absence of ovarian structures as follow: CL (Corpus Luteum); ovaries with a corpus luteum, DF (Dominant Follicle); ovaries with a dominant follicle, CL-DF: ovaries with that had both structures, and NO: Ovaries where neither CL nor DF were present. For each individual ovary, the number of follicles falling into three separate diameter categories was counted: 0 to 3 mm, 3 to 8 mm and more than 8 mm.

Collection of cumulus-oocyte complexes (COCs): COCs were obtained using the syringe aspiration method. For this, an 18G needle coupled to a 10 ml syringe was used. The follicles were punctured by directing the needle from inside the ovarian parenchyma and aspirating multiple follicles without removing the needle. Follicles of various sizes visible on the ovarian surface were punctured as per the requirements

of the experiment. The follicular fluid obtained was collected in 50 ml conical tubes, which were protected from light. The collected sample was allowed to settle for 10 minutes, after which the bottom portion was aspirated to collect the COCs. The remaining follicular fluid was centrifuged and the supernatant used for the identification of COCs under a stereomicroscope [12].

Morphological characterization of COCs: The aspirated COCs were subjected to two washes in the centrifuged follicular fluid. Subsequently, they were visualized and photographed using an Eclipse E-300 inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with an attached Nikon camera. The captured microphotographs of each registered COC were qualitatively visually characterized by the same technician based on the following criteria:

- Oocyte coating by Cumulus Cells (CC): Oocytes that were completely surrounded by CC were classified as “totally covered.” Those with discontinuity in CC layers were categorized as “partially covered,” and oocytes without CC were labeled as “naked.”
- Qualitative thickness of the CC layers: COCs with the most layers of CC were given a score of “3”. Those with an intermediate number of layers received a score of “2,” and COCs with only 1 or 2 CC layers were scored as “1.”
- CC compaction: CCs that exhibited a close association with each other were classified as “compact.” Those that showed slight relaxation, with some areas of more relaxed CC, were labeled as “slightly relaxed.” CCs that appeared loosely associated and held together by a “sticky” matrix were categorized as “relaxed.”
- Ooplasm homogeneity: Oocytes with granulations homogeneously distributed in their cytoplasm were classified as “homogeneous.” Oocytes with agglomerated granulations forming black dots, vacuoles, or retracted cytoplasm were labeled as “nonhomogeneous.”

Microscopy images were also analyzed using Fiji software. The following measurements were performed:

- Thickness of the CC layers: The thickness of the CC layers surrounding each COC was measured from the refringence of the Zona Pellucida (ZP) of the oocyte to the last CC layer that completely surrounded it.
- Area, perimeter, and diameter of the ooplasm: After treatment with hyaluronidase enzyme (Sigma, H3884-50MG, 0.5 mg/ml) for 5 minutes, microphotographs of the oocytes were taken. Subsequently, the parameters of diameter, area, and perimeter were measured (excluding the ZP).
- ZP thickness: Similar to the previous determination, the thickness of the ZP was measured in naked oocytes.

Biological characterization of COCs

Several biological parameters were analyzed in the collected oocytes:

- DNA integrity by Hoechst 33342 stain: After the hyaluronidase treatment, the oocytes were immersed in a solution of Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at a concentration of 1 µg/ml for 10 minutes in the dark. Subsequently, they were observed under an epifluorescence microscope using a filter range of excitation 360±40 nm and fluorescence emission 460±50 nm.
- Viability assay by vital staining with propidium iodide (PI): PI (5 µg/ml, Sigma-Aldrich), is a dye that binds to double-stranded DNA but is excluded from cells with intact plasma membrane. The staining process was the same as that performed with Hoechst 33342. Images were acquired using fluorescence microscope with an excitation wavelength of 568 nm and an emission range of 580-660 nm.
- Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by Rhodamine 123 (R123) staining: $\Delta\Psi_m$ serves as an indicator of mitochondrial activity since the membrane plays a vital role in ATP production, redox balance, cell signaling, and metabolism. Oocytes were incubated with 10 µg/ml R123 in the dark for 15 minutes at 37 °C. Fluorescence microscopy was used to capture images with an excitation wavelength of 488 nm and an emission range of 515-575 nm. The Fiji software was employed to analyze the fluorescence intensity of each oocyte. Subsequently, the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) was calculated for each oocyte using a previously described method (<https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescenceusing-imagej.html>).

Statistical analysis

Each determination was conducted in triplicate, with some trials being quadruplicated or quintuplicated. The obtained data were analyzed using the InfoStat program [13], and post-hoc comparisons were performed using Bonferroni's test. The values are presented as means \pm SEM (standard error of the mean). A significance level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and Discussions

It has been widely recognized that the intrinsic quality of the oocyte is a critical limiting factor in blastocyst production rates. Controlling variables such as the stage of the estrous cycle, stage of the follicular wave, and origin of the ovaries becomes challenging when samples from slaughterhouses are used. Therefore, it becomes necessary to characterize the ovaries and oocytes, as the population is heterogeneous, leading to significant variability in oocyte quality.

Ovarian characterization

The presence of structures associated with the estrous cycle and the size of follicles in the ovaries appear to be linked to the competence of oocytes for embryonic development. Consequently, a characterization of the ovaries obtained from the Coronel Moldes slaughterhouse (Río Cuarto, Córdoba, República Argentina) was conducted based on the presence of Corpus Luteum (CL), Dominant Follicle (DF), both structures (CL+DF), or neither (NO). Additionally, the size of the follicles observed on the surface of the ovary, which were subsequently aspirated, was also considered. Figure N° 2 (A) provides a summary of the mean \pm SEM indicating the presence or absence of ovarian structures related to the estrous cycle. The results revealed that ovaries containing both Corpus Luteum (CL) and Dominant Follicle (DF) structures (42.71 \pm 8.82%) had the highest proportion compared to those with only one type of structure (CL: 14.16 \pm 4.55%; DF: 23.90 \pm 5.09%) or none (19.22 \pm 3.76%). The importance of conducting this characterization lies in establishing a simple and non-invasive method to optimize the selection of competent oocytes for future *in vitro* reproductive technologies.

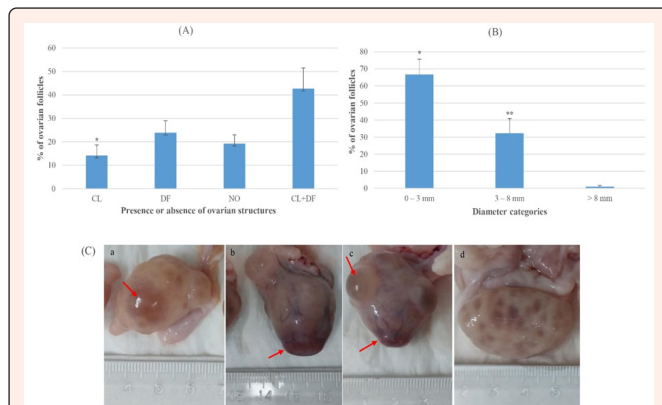


Figure N° 2: Morphological characterization of the ovaries. (A) Percentage of ovaries according to the presence of CL, DF, both CL+DF structures or their absence (NO). * $p < 0.05$ vs percentage of ovaries with CL+DF. Values indicate means \pm standard error of 5 experiments. (B) Number of follicles per ovary according to diameter categories (0-3 mm, 3-8 mm and ≥ 8 mm). * $p < 0.05$ vs percentage of ovaries with follicles of size 3-8 mm and vs > 8 mm. ** $p < 0.05$ vs percentage of ovaries with follicles of size 0-3 mm and vs > 8 mm. Values indicate means \pm standard error of 5 experiments. (C) Photographs of the ovary classification carried out according to morphology. The red arrows indicate the different ovarian structures a) DF; b) CL; c) CL+DF; d) NO.

Previous studies have shown varying results in the selection of ovaries based on the presence of these structures. For example, Varisanga et al. [14] reported a negative effect on the development of bovine embryos produced by *In Vitro* Fertilization (IVF) when a dominant follicle was present. Other studies [15,16] demonstrated negative effects on oocyte competence in ovaries with corpus luteum. Conversely, Manjunatha et al. [17] concluded that oocyte development was highest in pairs of ovaries with a corpus luteum and without a dominant follicle. Despite these discrepancies, selecting

ovaries based on the presence of structures related to the estrous cycle may aid in accessing oocytes with improved developmental competence for *in vitro* technologies. However, further investigation is required to determine the positive or negative effects of ovarian structures on oocyte competence and subsequent embryonic development [2].

The size of ovarian follicles is another criterion commonly used to obtain high-quality Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) [2,8]. The bar graph in Figure N° 2 (B) displays the percentages found for the three categories established after performing the corresponding statistical analysis (ANOVA and Bonferroni test) using five independent repetitions. The majority of follicles found in the ovaries corresponded to the size range of 0-3 mm, accounting for a percentage of 66.71 \pm 8.97%. The next highest proportion was observed in follicles with a diameter between 3-8 mm, representing 32.31 \pm 8.63%, while follicles larger than 8 mm comprised only 0.96 \pm 0.67% of the total. The size of the follicles determines the method for obtaining oocytes and their maturation. *In vivo*, oocytes that resume meiosis successfully typically originate from dominant follicles with a size of approximately 15 mm [18]. For the selection of potentially competent Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) for *in vitro* maturation, small (3-5 mm) and medium (6-10 mm) antral follicles are commonly utilized [8]. In the Hansen Laboratory Protocol [19], ovaries from slaughterhouses are classified as "good" when they contain a large number of small and medium-sized follicles, which are then used to obtain COCs for *in vitro* maturation. Pavlok et al. [18] categorized COCs into three ranges of follicle size: small (less than 2 mm), medium (2-4 mm), and large (4-8 mm in diameter). Their study revealed that oocytes from medium and large follicles exhibited greater developmental potential compared to those from small follicles. This suggests that the follicles visible in the cortex of ovaries obtained from animals at the local slaughterhouse can be predominantly aspirated and used for *in vitro* maturation, *In Vitro* Fertilization (IVF), and embryo culture, as more than 90% of them fall within appropriate size ranges.

COC characterization

To further characterize the samples, we analyzed the distribution of Cumulus Cells (CC) surrounding the oocytes and classified them into three categories: total coverage (oocytes completely surrounded by cumulus cells in their entire perimeter), Partial coverage (oocytes with cumulus cells present, but with some areas showing discontinuity in the cumulus cell layers), naked oocytes (oocytes that did not have cumulus cells surrounding them). The data obtained from this analysis is presented in Figure N° 3. The analysis of cumulus cell (CC) distribution revealed that approximately 90% of evaluated oocytes were completely covered by CC (87.83 \pm 8.74%), while 10.27 \pm 6.88% showed partial coverage, and only 1.90 \pm 1.90% were denuded. In the context of *in vitro* embryo production, good quality COCs typically exhibit certain morphological characteristics such as compact and complete CC shells, a homogeneous ooplasm with fine granulation, and a brown color [19,20]. The high percentage of COCs with total coverage observed in the raw material used in this study is a promising starting point for their utilization in future *in vitro* embryo production protocols (Figure N° 4).

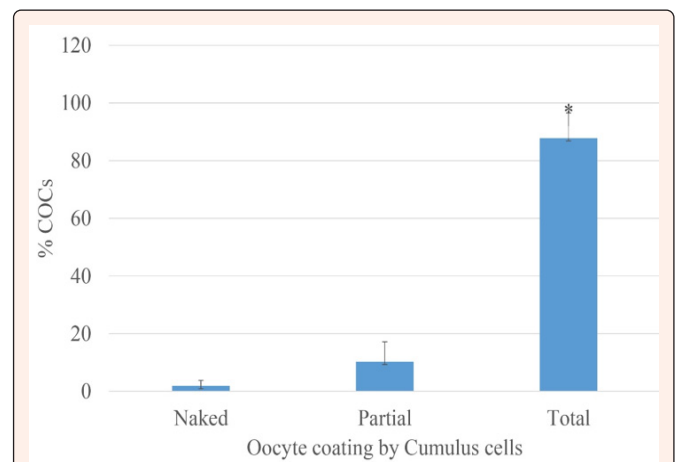


Figure N° 3: Bar graph depicting the percentages of COCs according to oocyte coverage by cumulus cells. * $p < 0.05$ vs percentage of denuded COCs and vs percentage of COCs partially covered by cumulus cells. The values represent the means \pm standard error of four experiments.

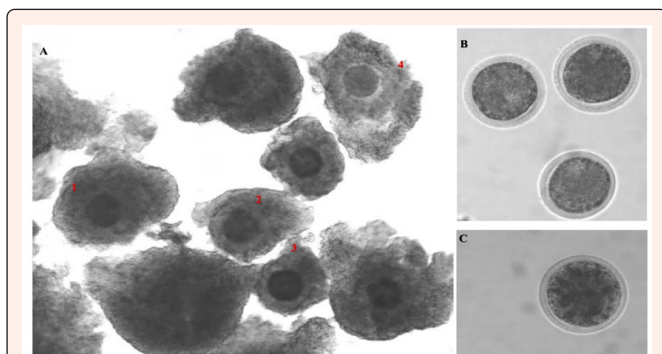


Figure N° 4: Microphotographs of different classes of oocytes based on their morphology. A) Examples of COCs characterized as 1- completely surrounded by CC, appearing compact and with the maximum number of CC layers; 2- COC with full coverage, compact CC and with an intermediate number of CC layers; 3- COC with full coverage and the minimum number of CC layers; 4- COC with full coverage, but with slightly expanded layers of CC. B) The images show oocytes with a homogeneous ooplasm; C) oocyte with non-homogeneous ooplasm, characterized by the presence of black granules.

Subsequently, we investigated whether the qualitative thickness of the CC layers was related to the quantitative thickness of the CC layers (Figure N° 5 A). As described in the Materials and Methods, COCs were categorized as “1” for those with the least amount of layers, “2” for intermediate amount, and “3” for those with considerable CC layers. We aimed to determine if there was a correlation between these two characteristics, specifically the average thickness of CC layers for COCs classified as 1, 2, and 3. The results indicated that the average thickness of CC layers for COCs classified as 1 was 0.05 mm, for 2 it was 0.08 mm, and for 3 it was 0.13 mm. Furthermore, to statistically validate if there were differences among these three averages and to group the observed characteristics (number of layers 1, 2, and 3) into three quantitative categories based on average thickness (0.05, 0.08, and 0.13 mm), variance analysis (ANOVA) was performed using the InfoStat program. Table N° 1 displays the obtained values. The results show a significant difference in the average thickness of the Cumulus Cell (CC) layers among the three groups, allowing for the establishment of three different categories based on the quantitative and qualitative variables of CC layer thickness. Specifically, qualitative variable 1 corresponds to an average thickness of CC layers of 0.05 mm, variable 2 corresponds to 0.08 mm, and variable 3 corresponds to 0.13 mm. The significance of these findings lies in the transformation of a qualitative and subjective selection characteristic of Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) into a quantitative and objective one. This measurement can serve as a new non-invasive marker for potentially competent COCs, as criteria for selecting and classifying oocytes vary among researchers and can be subjective and dependent on the evaluator’s experience [2].

Table N° 1: Mean ± SEM of the thickness determinations of the CC layers of COCs with “1”, “2” or “3” layers amount.

| Variable | n | Mean ± SEM |
|----------------------------|-----|-------------------|
| Thickness of CC layers “1” | 18 | 0.05 ± 0.01 mm* |
| Thickness of CC layers “2” | 70 | 0.08 ± 0.004 mm** |
| Thickness of CC layers “3” | 122 | 0.13 ± 0.003 mm |

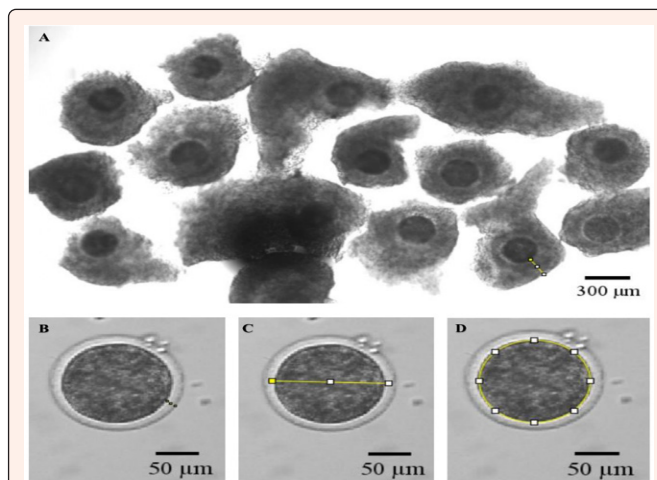


Figure N° 5: microphotographs illustrating the measurements obtained through the Fiji software are shown for: A) thickness of the CC cover; B) ZP thickness; C) ooplasm diameter; D) ooplasm area and perimeter.

Additionally, the results demonstrate that the ovarian samples used in the study had 58.09% of COCs belonging to the category with the highest average thickness of CC layers and 33.33% in the category with an average thickness of 0.08 mm, making up a total of 91.42%. Thus, the samples from the slaughterhouse can be concluded to be of excellent quality based on the intrinsic characteristics analyzed. Regarding the compaction degree of CCs in the aspirated COCs, three categories were distinguished: compact, slightly relaxed, and relaxed (Figure N° 4). The statistical evaluation, based on four independent repetitions, yielded the following mean values: compact $69.66 \pm 7.86\%$, slightly relaxed $21.92 \pm 7.86\%$, relaxed $8.41 \pm 7.86\%$. The analyzed samples predominantly consisted of COCs with compact CCs, with a significantly higher percentage compared to the slightly relaxed and relaxed categories. According to COC selection criteria proposed by authors such as Aguila et al. [2] and Madison et al. [21], both COCs with compact CCs and slightly relaxed/expanded CCs are considered good quality for subsequent *in vitro* tests. Taking these principles into account, the ovaries from the Coronel Moldes slaughterhouse rendered 91.58% of COCs with compact or slightly relaxed CCs, which are considered of good quality for use in *in vitro* embryo production technologies. This implies that around 90% of the aspirated COCs from the studied samples possess the desired characteristics in terms of CC coverage, CC thickness, and compaction quality for selection in *in vitro* tests.

In terms of ooplasm, oocytes with uniformly granulated cytoplasm without clear spaces are typically selected for *in vitro* maturation [19]. Based on this criterion, the oocytes were analyzed for cytoplasmic homogeneity, resulting in $83.11 \pm 4.27\%$ of oocytes with homogeneously granulated cytoplasm, indicating good quality according to the analyzed characteristic (Figure N° 4). Previous studies, such as those conducted by Leibfried [7], suggest that oocytes with granules that aggregate or are unevenly distributed, leading to the merging of black bodies or an uneven filling of the zona pellucida, exhibit signs of atresia or degeneration and possess limited or no developmental competence. However, more in-depth studies, such as those conducted by Nagano et al. [3], have observed that black granules do not always indicate atresia but may be due to lipid accumulations, which are associated with a high potential for development. They further concluded that a dark ooplasm indicates lipid accumulation and good developmental potential, while a light-colored ooplasm indicates low

organelle density and a black ooplasm indicates aging, both with low developmental potential. Therefore, although high percentages of oocytes with homogeneous cytoplasm were obtained, further investigation is needed to determine if the black dots observed correspond to lipid droplets or are indicative of atresia in the remaining 17% of oocytes with non-homogeneous cytoplasm.

In addition, various physical parameters were determined for the naked oocytes to further characterize them and explore potential relationships between morphology and quality (Figure N° 5). Using the Fiji software, the following measurements were obtained: average ooplasm area of $12 \pm 0.37 \mu\text{m}^2$, average ooplasm perimeter of $387.5 \pm 10 \mu\text{m}$, average ooplasm diameter of $123 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (excluding the zona pellucida) (Figure N° 5, C and D), and average thickness of the Zona Pellucida (ZP) of $12.2 \pm 0.17 \mu\text{m}$ (Figure N° 5 B). Regarding the ooplasm diameter parameter, which is commonly used as a selection criterion for potentially competent oocytes, Otoi et al. (1997) [9] reported an average diameter of $114.0 \pm 4.8 \mu\text{m}$. They found that oocyte diameter is related to developmental competence, with oocytes acquiring full meiotic competence at a diameter of $115 \mu\text{m}$, but a diameter of $120 \mu\text{m}$ being required for blastocysts to achieve full developmental competence. On the other hand, Hyttel et al. [8] reported different results, where oocytes needed a diameter of approximately $100 \mu\text{m}$ to acquire full competence for meiotic resumption, and a diameter of around $110 \mu\text{m}$ to maintain embryonic development competence.

Studies conducted on human oocytes have also demonstrated a relationship between ZP thickness and developmental capacity [10]. Similar results have been observed in other species such as pigs and buffalos, suggesting that this trend may be conserved across different species, including cattle [6]. Due to these subtle variations observed in different systems, it was necessary to characterize the intrinsic values of the oocytes obtained from the Coronel Moldes slaughterhouse samples to better understand their specific characteristics. In terms of nuclear morphology and oocyte metaphase arrest, no alterations were observed in the nuclear morphology of any oocyte (Figure N° 6), and 100% of the oocytes exhibited metaphase arrest. This indicates that the oocytes obtained from the ovaries of animals from the local slaughterhouse were in a developmentally competent state at the time of collection.

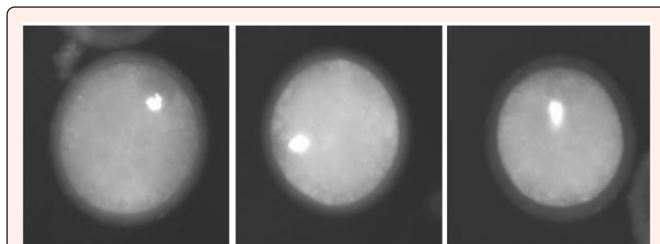


Figure N° 6: Hoechst-stained oocytes displaying no alterations in nuclear morphology.

Regarding cell viability, only $2.39 \pm 0.11\%$ of the oocytes stained with Propidium Iodide (PI) emitted fluorescence, indicating cell death, while the majority of the population, $97.61 \pm 0.11\%$, remained viable. This demonstrates that the vast majority of the oocytes used in the study were alive and maintained intact plasma membranes. Furthermore, all the oocytes analyzed exhibited mitochondrial activity as they were stained by Rhodamine 123 (R123) and displayed fluorescence. The fluorescence intensity of R123 was measured using the Fiji software, and three subpopulations were established based on fluorescence intensity ranges: low CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence), intermediate CTCF, and high CTCF. Interestingly, each range accounted for 33.33% of the total number of oocytes, indicating a relatively equal distribution. This suggests that a significant proportion of the oocytes (66.66%) exhibited intermediate to high mitochondrial functionality.

Conclusion

The comprehensive morphological and biological characterizations of the ovaries, Cumulus-Oocyte Complexes (COCs), and oocytes obtained from the Coronel Moldes slaughterhouse in Río Cuarto, Córdoba, República Argentina have provided valuable insights. The analysis of the ovaries revealed a predominance of samples with both Corpus Luteum (CL) and Dominant Follicle (DF) structures, indicating a higher potential for oocyte development. Furthermore, the size distribution of the follicles in the ovaries demonstrated that a significant proportion of the follicles fell within the range typically used for *In Vitro* Maturation (IVM), *In Vitro* Fertilization

(IVF), and *in vitro* embryo production (IVP) experiments. This suggests a plentiful supply of Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) for further studies. The morphological and biological determinations conducted on the COCs and oocytes indicated that approximately 90% of them exhibited good quality characteristics. These included complete coverage by cumulus cells, desirable thickness of cumulus cell layers, compactness of cumulus cells, homogeneous ooplasm, absence of nuclear alterations, arrested in metaphase I, high viability, and mitochondrial functionality. These findings validate the suitability of the ovaries from the local slaughterhouse as a reliable source of high-quality COCs for use in IVP trials.

In summary, the characterization of both the ovaries and their derived COCs and oocytes from the Coronel Moldes slaughterhouse has provided valuable insights and demonstrated their potential for use in *in vitro* reproduction technologies. The abundance of good quality COCs from these ovaries opens up opportunities for further advancements in IVM, IVF, and IVP research.

References

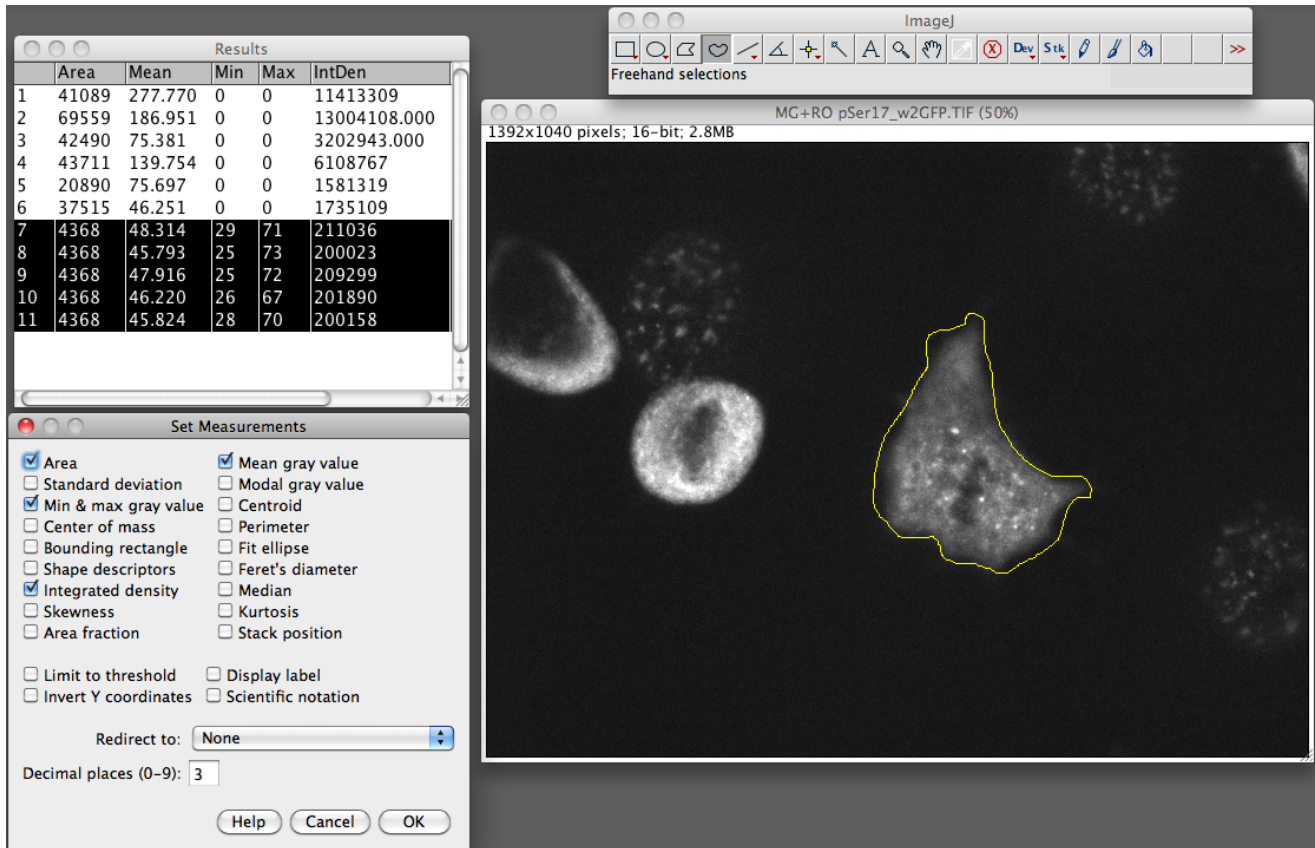
- Nagano M (2019) Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine oocytes. *J Reprod Dev* 65(3): 195-201.
- Aguila L, Treulen F, Therrien J, Felmer R, Valdivia M, et al. (2020) Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals* 10(12): 2196.
- Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y (2006) Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote* 14(1): 53-61.
- Lonergan P, Fair T (2016) Maturation of oocytes *in vitro*. *Annual Review of Animal Biosciences* 4: 255-268.
- Nagano, 2018. Nagano, M. (2018b). Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine oocytes.
- Timlin CL, Lynn A, Wooldridge LK, Uh K, Ealy AD, et al. (2021) Physical parameters of bovine activated oocytes and zygotes as predictors of development success. *Zygote* 29(5): 358-364.
- Leibfried L, First NL (1979) Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science* 48(1): 76-86.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47(1): 23-32.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997) Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48(5): 769-774.
- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, et al. (2012) Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertility and Sterility* 98(1): 77-83.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature* 9(7): 676-682.
- <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescenceusing-imagej.html>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, et al. (2018) InfoStat version. InfoStat Group, FCA, National University of Córdoba, Argentina.
- Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T (1998) Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. *Theriogenology* 50(7): 1015-1023.
- Hajarian H, Shahsavari MH, Karami-Shabankareh H, Dashtizad M (2016) The presence of corpus luteum may have a negative impact on *in vitro* developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology* 16(1): 47-52.
- Karami Shabankareh H, Hamed Shahsavari M, Hajarian H, Moghaddam G (2015) *In vitro* developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. *In Iran J Reprod Med* 13(10): 615-622.
- Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, et al. (2007) *In vitro* developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 68(6): 882-888.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H (1992) Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* 31(1): 63-67.



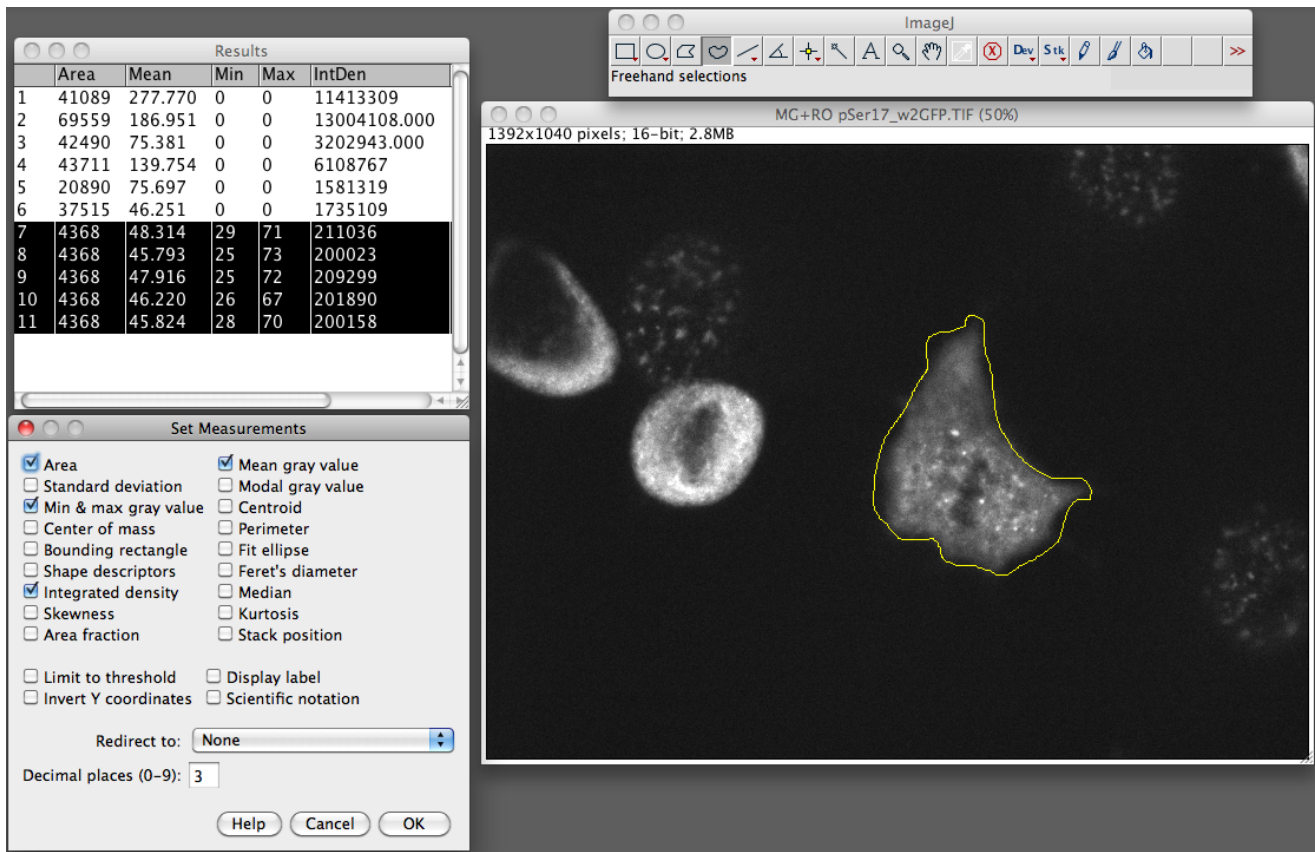
19. Hansen Laboratory PJ (2017). *In Vitro* production of bovine embryos.
20. Ihazeleper N L, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS (1994) Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 43(19): 509-522.
21. Madison V, Avery B, Greve T (1992) Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 27(1): 1-11.

Measuring cell fluorescence using ImageJ

Determining the level of cellular fluorescence from fluorescence microscopy images in ImageJ



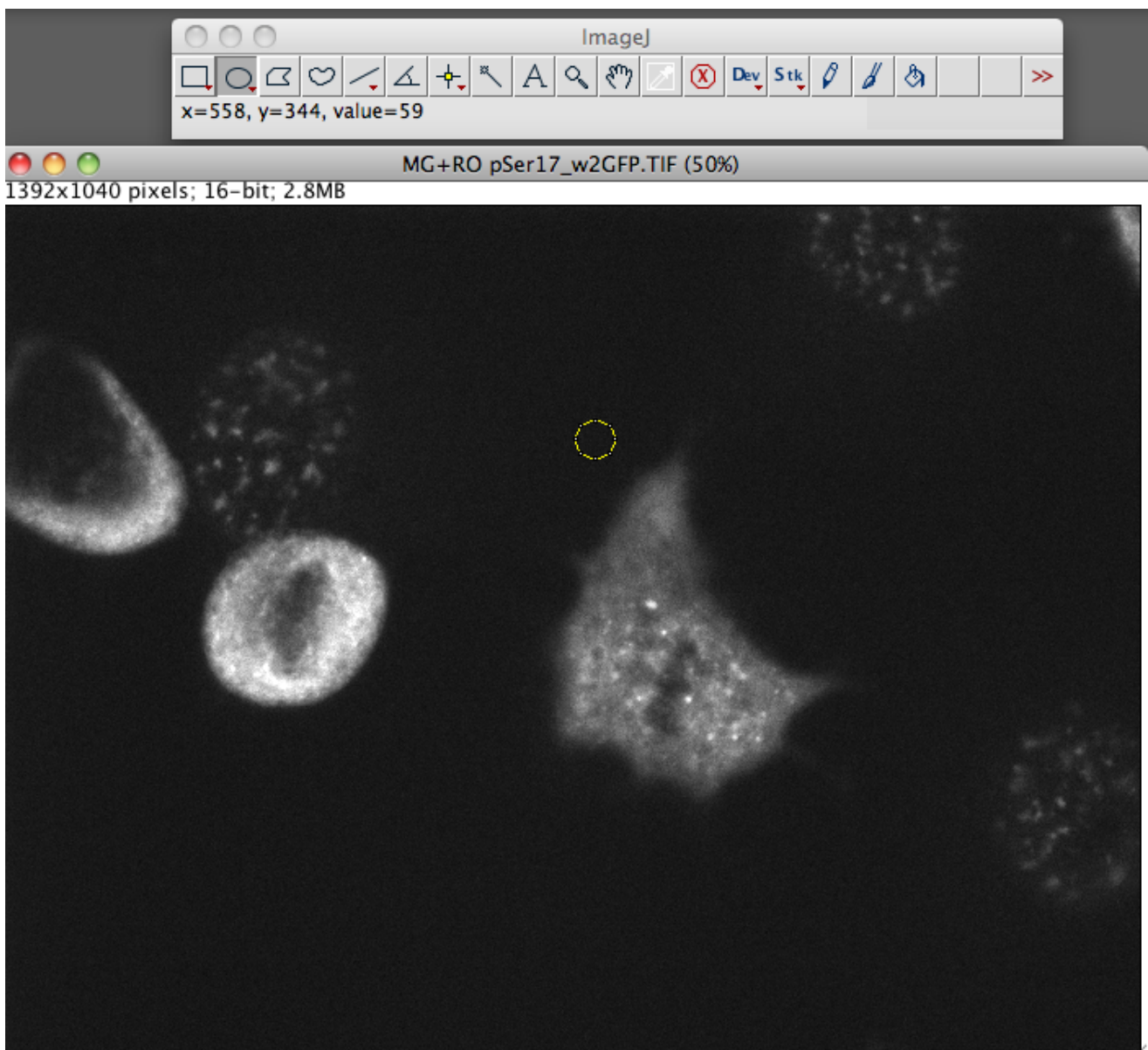
- Open ImageJ. Note: ImageJ may be freely downloaded from [here] (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)
- Select the cell of interest using any of the drawing/selection tools (i.e. rectangle, circle, polygon or freeform)



- From the Analyze menu select “set measurements”. Make sure you have **area integrated intensity** and **mean grey value** selected (the rest can be ignored).
- Now select “Measure” from the analyze menu. You should now see a popup box with a stack of values for that first cell.
- Now go and select a region next to your cell that has no fluorence, this will be your background.

Repeat this step for the other cells in the field of view that you want to measure.

NB: Size is not important. If you want to be super accurate here take 3+ selections from around the cell.

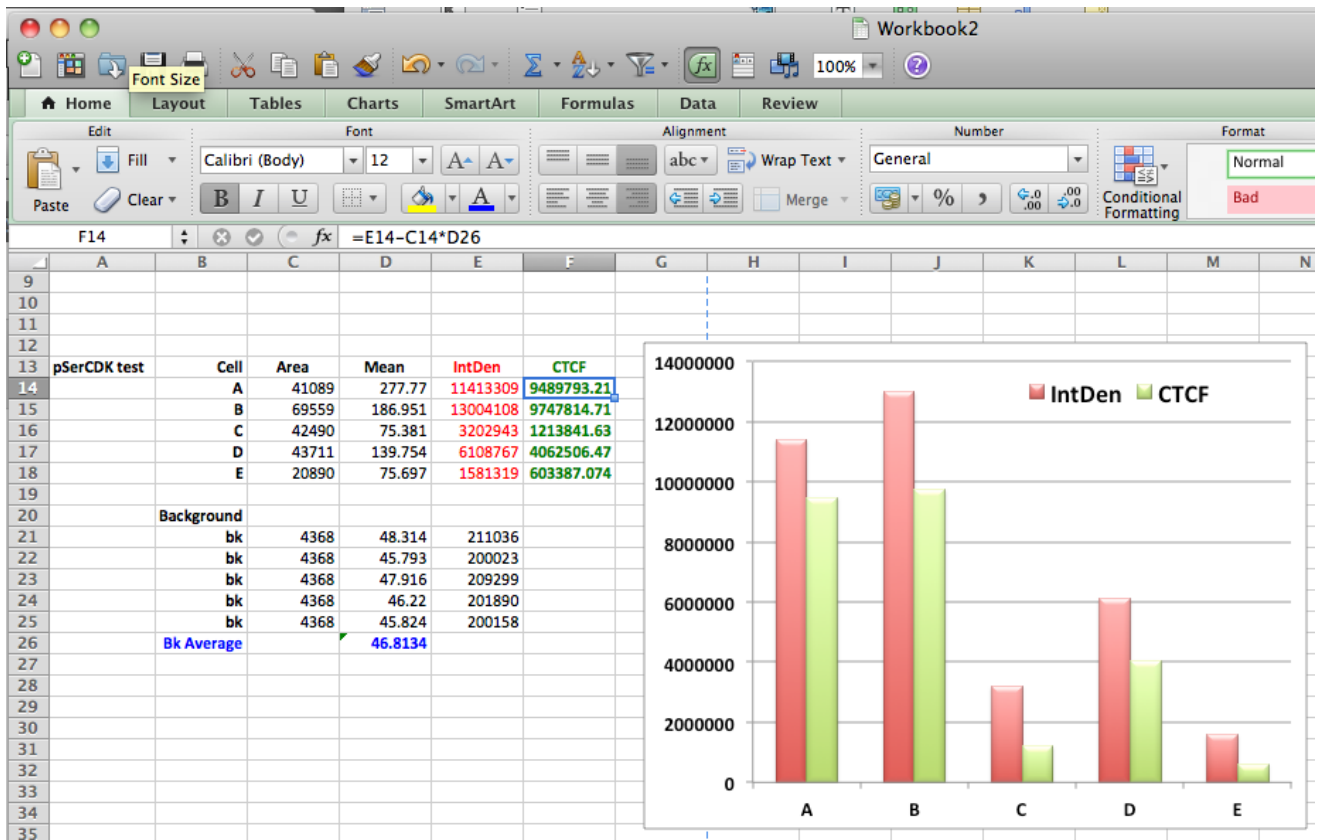


- Once you have finished, select all the data in the Results window and copy and paste into a new spreadsheet (or similar program)
- Use this formula to calculate the corrected total cell fluorescence (CTCF).

CTCF = Integrated Density - (Area of selected cell X Mean fluorescence of background readings)

- Make a graph and your done.

Notice that rounded up mitotic cells appear to have a much higher level of staining due to its smaller size concentrating the staining in a smaller space. If you used the raw integrated density you would have data suggesting that the flattened cell has less staining then the rounded up one, when in reality they have a similar level of fluorescence.



<https://sciencetechblog.files.wordpress.com/2011/05/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.pdf>

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE
SELECCIÓN DE OVOCITOS BOVINOS
PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN *IN*
VITRO DE EMBRIONES Y LA
TRANSGÉNESIS ANIMAL

