



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEINA NANOG
EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES
PRODUCIDOS IN VITRO POR FIV Y
PARTENOGENÉISIS EN PEQUEÑOS RUMIANTES.**

Tesis de Master

Valencia, Septiembre 2016

Patricia Martínez María

Director:

Maria Teresa Paramio Nieto

Codirector:

José Salvador Vicente Antón



RESUMEN.

Desde que se desarrollaron las técnicas de producción de embriones *in vitro* existe una demanda de métodos que permiten evaluar la calidad de los embriones generados. Uno de los criterios de la calidad de los blastocistos producidos es la relación entre el número de células del Masa Celular Interna (MCI) y del Trofoectodermo (TE). La proteína Nanog y la Cdx2, son proteínas que se encuentran en la MCI y TE, respectivamente en embriones de ratón. El objetivo de este trabajo fue poner a punto en nuestro laboratorio en embriones caprinos y ovinos producidos por fecundación *in vitro* (FIV) y partenogénesis, el análisis de inmunodetección de la proteína Nanog.

Producimos 640 embriones ovinos mediante FIV y 1083 embriones por activación partenogénica (AP). En caprino producimos 205 embriones por FIV y 66 por AP. Los embriones producidos son agrupados en tres grupos: embriones de 2 a 8 células, mórulas y blastocistos. Las técnicas utilizadas para la FIV y AP son las rutinarias del laboratorio. Para el análisis de la proteína Nanog utilizamos 286 embriones con diferentes protocolos hasta optimizar el adecuado para ovino y caprino.

Utilizando el protocolo de inmunodetección original (de ratón), se observó que la proteína Nanog necesitó una optimización para los embriones de oveja y cabra, cambiando el anticuerpo primario original *rabbit polyclonal anti-Nanog* por *rabbit anti-Human Nanog*. Encontramos expresión de la proteína Nanog en cada célula de embriones de 2-8 células, mórulas y blastocistos, contrariamente a lo esperado ya que la proteína Nanog de ratón solo se localiza en las células MCI y no en los anteriores estadios embrionarios. En nuestros blastocistos producidos se observa que el número de células con señal Nanog es del 66'7% y 89'6% en ovino, y 83'6% y 60'5% en caprino del total de células, lo que indica que esta señal estuvo localizada también en las células del TE y no solo en las del MCI, como era lo esperado. El Cdx2 se localizó en el 68'97% de las células del blastocisto, indicando que era correcto su marcaje solo en las TE. En conclusión nuestros datos no muestran diferencias significativas entre los embriones de ovino y caprino producidos mediante FIV y AP.

ABSTRACT.

Since the development of techniques for in vitro embryo production there is an important demand of methods to assess the quality of the generated embryos.

One of the main criteria to assess the quality of produced blastocysts is the ratio between the number of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE).

Nanog and Cdx2 proteins are founded in the ICM cells and TE cells respectively in mouse embryos. The aim of this work was tune up, in our laboratory, the immunodetection analysis of Nanog protein in goat and sheep embryos produced by in vitro fertilization (IVF) and parthenogenesis.

We have produced 640 ovine embryos by IVF and 1083 by parthenogenetic activation (PA). In caprine we produced 205 embryos by IVF and 66 by PA. All produced embryos are grouped in three different groups: 2 to 8 cells embryos, morulae, and blastocysts. We used the routine techniques of laboratory to carry out IVF and PA. For the Nanog protein analysis we used 286 embryos and different protocols were performed to optimize the suitable one for sheep and goats.

By using the original immunodetection protocol (mouse), it was observed that Nanog protein needed an optimization by changing the primary antibody from the original (*polyclonal rabbit anti-Nanog*) to the human one (*rabbit anti-Human Nanog*). We found expression of Nanog protein in each cell in: 2-8 cells embryos, morulae and blastocysts. It was contrary to our expectations considering that the mouse Nanog protein is localized, in blastocysts, only in the ICM cells and it is not found in the previous embryonic stages. Our produced blastocysts shows Nanog signal in 66'7% and 89'6% en sheep, and 83'6% and 60'5% in goat of total cells, which indicates that this signal was also localized in the TE cells and not only on the ICM, as it was expected. The Cdx2 was located in 68'97% of cells in the blastocyst stage, indicating that the labeling was correct only in the TE. In conclusion, our data do not show significant differences between sheep and goat embryos produced by IVF and PA.

ABREVIACIONES.

6-DMAP: 6- dimetilpurina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AP: Activación partenogenética.

ATB: antibiótico-antimicótico.

BSA: (Bovine serum albumin) Albúmina sérica bovina.

CIV: Cultivo in vitro.

COCs: Complejo cúmulus-oocito.

DAPI: 4', 6-diamino-2-fenilindol.

d.s.: Desviación estándar.

E2: Estradiol.

EGF: (Epidermal growth factor) Factor de crecimiento epidérmico.

EGCs: (Embryonic germ cells) Células germinales embrionarias.

ESCs: (embryonic stem cells) Células madre embrionarias.

FIV: Fecundación in vitro.

FSH: (Follicle stimulating hormone) Hormona folículo estimulante.

ICSI: (intracytoplasmic sperm injection) Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

JIVET: *Juvenile in vitro embryo technology.*

LIF: (Leukemia inhibitory factor) Factor inhibidor de leucemia.

LH: (Luteinizing hormone) Hormona luteinizante.

MCI: Masa celular interna.

MII: Metafase II

MIV: Maduración in vitro.

ON: (overnight) toda la noche.

PAF: Paraformaldehido.

PBS: Phosphate buffered saline.

PCR: (Polymerase chain reaction) Reacción en cadena de la polimerasa.

PIVE: Producción in vitro de embriones.

RT: (room temperature) temperatura ambiente.

SFB: Suero fetal bovino.

SOC: Suero de oveja en celo.

SOF: Medio sintético de oviducto.

TE: Trofoectodermo.

FIGURAS.

Figura 1. Desarrollo embrionario preimplantacional en embriones de pequeños rumiantes.

Figura 2. Compactación y polarización celular en el desarrollo embrionario preimplantacional.

Figura 3. Genes cruciales para la segregación de los linajes celulares.

Figura 4. Etapas y actividad molecular asociados al desarrollo embrionario temprano en ratón.

Figura 5. Esquema de factores de transcripción en células madre embrionarias.

Figura 6. Ovarios de hembra caprina prepúber, técnica de slicing y COCs seleccionado.

Figura 7. Localización de la expresión de la proteína Nanog.

Figura 8. Localización nuclear: nucléolo y nucleoplasma.

Figura 9. Intensidad de la expresión de la proteína Nanog.

Figura 10. Control (-) en blastocistos AP de cabra.

Figura 11. Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas de FIV y AP en ovino y caprino.

Figura 12. Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones partenogénicos de ovino

Figura 13. Señal de la proteína Nanog en nucléolos.

Figura 14. Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones FIV de ovino.

Figura 15. Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones partenogénicos de caprino.

Figura 16. Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones FIV de caprino.

Figura 17. Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas AP de ovino.

Figura 18. Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas FIV de ovino.

Figura 19. Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas AP de caprino.

Figura 20. Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas FIV de caprino.

Figura 21. Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocistos AP de ovino.

Figura 22. | Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocisto FIV de ovino.

Figura 23. Señal de la proteína Nanog en nucléolos.

Figura 24. Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocistos AP de caprino.

Figura 25. | Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocisto FIV de caprino.

Figura 26. Señal de la proteína Nanog en el nucleo.

Figura 27. Inmunodetección con Cdx2 en blastocistos joven de FIV de cabra.

Figura 28. Inmunodetección de Cdx2 en blastocisto expandido partenogenético de cabra.

Figura 29. Inmunodetección de Oct4 en mórulas FIV de ovino.

Figura 30. Inmunodetección de Oct4 en blastocisto AP de cabra.

TABLAS.

Tabla 1. Resultados de la producción in vitro de embriones de ovino y caprino.

Tabla 2. Variaciones del protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog en embriones de ovino y caprino.

Tabla 3. Protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog en embriones preimplantacionales de ovino y caprino.

Tabla 4. Recuento celular total y expresión de Nanog en blastocistos in vitro de pequeños rumiantes.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| Abreviaturas | 3 |
| Índice figuras y tablas | 5 |
| Capítulo 1: INTRODUCCIÓN | 11 |
| Capítulo 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1. Desarrollo embrionario preimplantacional. | |
| 2.1.1. Activación del genoma embrionario. | |
| 2.1.2. Polarización y compactación celular. | |
| 2.1.3. Diferenciación celular. | |
| 2.1.3.1 Primera segregación. | |
| • Factores de transcripción | |
| Capítulo 3: OBJETIVOS | 28 |
| Capítulo 4: MATERIAL Y MÉTODOS | 30 |
| 4.1 Producción in vitro de embriones. | |
| 4.1.1. Recogida y selección de oocitos. | |
| 4.1.2. Maduración in vitro. | |
| 4.1.3. Capacitación de los espermatozoides y Fecundación in vitro. | |
| 4.1.4. Activación partenogenética. | |
| 4.1.5. Cultivo de embriones in vitro. | |

| | |
|--|-----------|
| 4.2. Análisis Inmunocitoquímico de las proteínas Nanog y Cdx2. | |
| 4.2.1. Localización e Intensidad de la expresión de la proteína Nanog. | |
| Capítulo 5: RESULTADOS | 38 |
| 5.1. Producción de embriones in vitro (PIVE). | |
| 5.1.1. Producción de embriones ovinos. | |
| 5.1.2. Producción de embriones caprinos. | |
| 5.2. Optimización del protocolo de inmunodetección y localización de la proteína Nanog. | |
| 5.2.1. Nanog. | |
| 5.3. Comparación de la inmunodetección de la proteína Nanog entre embriones de FIV y AP en ovino y caprino. | |
| 5.3.1. Embriones de 2 a 8 células. | |
| 5.3.2. Mórulas. | |
| 5.3.3. Blastocistos. | |
| 5.4. Comparación entre blastocistos AP y FIV de la inmunodetección de la proteína Nanog. | |
| Capítulo 6: DISCUSIÓN | 57 |
| Capítulo 7: CONCLUSIONES | 64 |
| Capítulo 8: BIBLIOGRAFÍA | 66 |
| Anexos | 75 |

Capítulo 1:

Introducción.

Se ha producido un creciente interés en las técnicas de reproducción asistida. Las técnicas de reproducción asistida son utilizadas para aumentar la capacidad reproductora y la mejora genética de ovinos y caprinos. Mientras que sus aplicaciones se han generalizado en bovino, en los pequeños rumiantes es casi restringida a la inseminación artificial. No obstante, durante los últimos 30 años, se han logrado importantes avances en las tecnologías de embriones ovinos y caprinos.

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una tecnología indispensable para el estudio básico en la biología y la fisiología del desarrollo embrionario y para la investigación de las biotecnologías emergentes en las cuales se necesita la utilización de un gran número de embriones en los experimentos (por ejemplo el sexaje embrionario, inyección espermática, transferencia nuclear y transgénesis). Además la PIVE es de gran utilidad para la ayuda en la conservación de especies y razas en peligro de extinción. La posibilidad de tener descendencia utilizando la reserva de oocitos de las hembras y de poder producir embriones mediante la inyección de un espermatozoides (ICSI) incrementará de forma drástica la difusión de las características genéticas de los animales seleccionados y por lo tanto la intensificación de la mejora genética en los programas de selección.

La mayoría de laboratorios de investigación en PIVE recuperan los oocitos a partir de ovarios de matadero, ya que es un sistema que nos permite obtener embriones a bajo coste. En el laboratorio mediante la simulación de las características *in vivo* del desarrollo embrionario preimplantacional, los embriones se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto usando tres técnicas: la maduración *in vitro* (MIV) de oocitos recuperados de ovarios, seguidos por la fecundación *in vitro* (FIV) de oocitos madurados y a continuación el cultivo *in vitro* (CIV) de los oocitos fecundados hasta la fase de blastocisto que pueden ser transferidos a hembras receptoras o criopreservados para su futuro uso. Sin embargo, la PIVE todavía no es muy eficiente debido a varios factores limitantes que afectan el resultado en cada paso del proceso.

En nuestro laboratorio se realiza la JIVET (*juvenile in vitro embryo technology*), ya que se utilizan ovarios de hembras prepúberes de 3 a 4 meses de edad en oveja y

de 1 a 2 meses en cabras. Las ventajas de utilizar la JIVET son la obtención de un mayor número de oocitos por ovario en hembras prepúberes respecto de las adultas (Baldassarre *et al.* 2002), la reducción del intervalo generacional, la evaluación de animales reproductores antes de llegar a la edad reproductora y una mayor disponibilidad en el ámbito comercial. Por el contrario, estos embriones son considerados de mala calidad (comparándolos con embriones de hembras adultas) porque los oocitos prepúberes tienen una menor competencia para el desarrollo embrionario (revisado por Armstrong 2001).

El uso de estas técnicas para la obtención de embriones *in vitro* de hembras prepúberes ha generado la necesidad de evaluar la calidad embrionaria en el estadio de blastocisto y poder seleccionarlos para su utilización posterior en la investigación de células madre embrionarias o conseguir buenos resultados en la transferencia de embriones.

A la hora de determinar la calidad del blastocisto se pueden utilizar técnicas no invasivas como la morfología embrionaria (Van Soom *et al.* 2003), la cronología del desarrollo (Van Soom *et al.* 1997), la determinación de las tasas de eclosión de los blastocistos, tinción vital celular (Bredbacka *et al.* 1995), los test metabólicos (Donnay *et al.* 1999; Leoni *et al.* 2008) y la criopreservación (Rizos *et al.* 2002; Kuwayama *et al.* 2005). También existen técnicas invasivas como la tinción de Tunel, la tinción diferencial (Thouas *et al.* 2001), microscopia electrónica (Plante y King 1994) y análisis citogenético (Lonergan *et al.* 2004).

En el estadio de blastocisto se diferencian los dos linajes celulares principales: las células externas que conformaran el trofoectodermo (TE) con un aspecto muy similar a la células epiteliales, y las células agrupadas en un polo del embrión que conformarán la masa celular interna (MCI). Las técnicas para determinar la calidad del embrión ofrecen la posibilidad de analizar el número de células del blastocisto y la distribución de los dos linajes celulares. La calidad del blastocisto dependerá del ratio entre células de la MCI y células del TE. Por este motivo, en nuestro laboratorio la evaluación de los embriones se realiza mediante la tinción diferencial y el recuento posterior del numero de células de cada tipo celular. Sin embargo, esta tinción diferencia las células por su localización en el blastocisto y

no por sus características para diferenciarse en tipos celulares. Así, las células de la MCI se denominan pluripotentes porque de ellas se desarrollaran todos los tejidos del nuevo organismo. Contrariamente, las células del TE no son pluripotentes, y por tanto, su diferenciación dará lugar a las células de los tejidos placentarios.

En este estudio utilizamos la inmunodetección de marcadores específicos de estos dos tipos celulares (pluripotentes y multipotentes). La inmunodetección diferencial se basa en el reconocimiento de la proteína Nanog (inicialmente descrita por Chambers *et al.* 2003 en ratón) y Cdx2 (descrita por Beck *et al.* 1995 en ratón) por anticuerpos que las reconocen específicamente. Estas proteínas fueron detectadas en ratón en MCI y TE respectivamente. (Mallol *et al.* 2014)

Teniendo en cuenta la inmunodetección de la proteína Nanog y Cdx2 el objetivo general de este estudio es evaluar la calidad embrionaria mediante un análisis más específico de las células MCI y las del TE. Así podremos analizar las diferencias observadas entre embriones producidos mediante fecundación *in vitro* y activación partenogenética en las especies ovino y caprino.

Capítulo 2:

Revisión Bibliográfica.

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es un gran avance dentro de la producción animal en cualquier especie ganadera. Nos permite junto con la criopreservación de embriones la comercialización en todo el mundo, con una difusión de razas con valor genético o en peligro de extinción, y libre de patógenos (Paramio e Izquierdo 2014).

El primer nacimiento de un ternero tras la fecundación *in vitro* (FIV) fue en 1982 por Brackett *et al.*, Hanada *et al.* 1985 en caprino y en 1986 en ovino por Cheng *et al.* La PIVE imita el desarrollo embrionario que se produce fisiológicamente en la hembra desde antes de la ovulación hasta la implantación del embrión en el útero. La PIVE tiene diferentes fases donde es fundamental seleccionar oocitos mediante su morfología y el semen mediante gradiente o swim up. Esta metodología comienza con la maduración *in vitro* (MIV) que consiste en madurar los oocitos recuperados directamente de los folículos del ovario, la segunda fase es la FIV y por último, el cultivo *in vitro* (CIV). Es una técnica que nos permite la producción de embriones de hembras no fértiles (prepúberes, en gestación, en periodo de lactancia, muertas o sacrificadas).

En este estudio, se realiza la activación partenogenética (AP) para poder obtener un modelo *in vitro* con que poder comparar la FIV. Este proceso consiste en el desarrollo de un oocito sin la presencia del gameto masculino, una acción que no es fisiológica en mamíferos. Los embriones partenogenéticos se utilizan como modelo para la investigación y sin preocupaciones éticas sobre la destrucción de embriones viables, ya que su viabilidad es limitada debido a la falta de impronta masculina, lo que conduce a la muerte embrionaria (revisado por Paffoni *et al.* 2008). En condiciones fisiológicas, el oocito maduro se libera de la metafase II cuando la cabeza del espermatozoide entra en la zona pelúcida y desencadena oscilaciones de calcio intracelular. Con el proceso de activación partenogenética, imitamos este mecanismo con productos químicos, como la ionomicina. Además utilizamos el 6-DMAP para evitar la exclusión del segundo corpúsculo polar y así el oocito sigue su desarrollo como un cigoto $2n$ (con todo el material genético necesario).

En nuestro laboratorio trabajamos con una técnica llamada JIVET (*juvenile in vitro embryo transfer*), y consiste en la producción de embriones in vitro a partir de oocitos de hembras prepúberes con el objetivo de acortar los intervalos generacionales y por tanto aumentar la ganancia genética (Morton *et al.* 2008). Los animales con los que trabajamos tienen aproximadamente de 1 a 2 meses de edad en caprino y de 3 a 4 meses en ovino.

2.1. Desarrollo embrionario preimplantacional.

En los mamíferos, la vida de un organismo multicelular comienza con la unión de los gametos masculino y femenino. Después de la fecundación del oocito y tras una serie de cambios internos, se forman los dos pronúcleos, quienes darán comienzo a la primera división celular. Se conoce como desarrollo embrionario preimplantacional, a las siguientes divisiones embrionarias hasta el estadio de blastocisto eclosionado el cual se implantara en el útero.

En el periodo de desarrollo embrionario preimplantacional se diferencian tres transiciones principales (revisado por Wang y K. Dey 2006) con células con distintos potenciales para el desarrollo en cada una de ellas. La activación del genoma embrionario, la polarización y compactación celular; y por último la diferenciación celular donde se formará el blastocisto.

2.1.1. Activación del genoma embrionario.

Desde el estadio de cigoto hasta la activación del genoma embrionario, el cigoto es el encargado de controlar la expresión génica y la embriogénesis por otros métodos. En estas etapas tempranas del desarrollo embrionario, existe un sistema de emergencia que implica la utilización de material almacenado en el citoplasma del oocito. Por tanto, esta información genética de origen materno que está contenida en forma de RNAm y proteínas, es la responsable del control de la embriogénesis en ratón (revisado por Zernicka-Goetz *et al.* 2009) (Fig. 1).

Dichas proteínas tienen una vida media y se van degradando así como el RNAm, que, una vez traducido a proteína se degrada. Estos transcritos maternos se irán eliminando progresivamente a medida que aparece la expresión del genoma

embrionario. Aquí es donde tiene lugar la transición materno-cigótica (Schier 2007).



Figura 1 | Desarrollo embrionario preimplantacional en embriones de pequeños rumiantes.

La activación del genoma embrionario tiene diferentes inicios según la especie. En pequeños rumiantes y otras especies como equinos y bovinos tiene lugar entre los estadios de 8 y 16 células, en el cuarto ciclo celular (Hyttel *et al.* 2010). En el caso del ratón el genoma embrionario se activa en el primer ciclo celular o 2 células, y en cerdos en 4 células o en el tercer ciclo celular (Hamatani *et al.* 2004). Esta actividad se corresponde con el hecho de que los embriones *in vitro*, a menudo, se bloquean en el estadio de dos células (en ratón) porque no son capaces de activar el genoma. La expresión génica tan temprana, es característica de los mamíferos y es necesaria para la complejidad del desarrollo embrionario inicial.

2.1.2. Polarización y compactación celular.

En la segunda transición se establece la polaridad celular y la compactación para formar el estadio de mórula. Las olas de expresión génica son importantes para controlar una serie de decisiones, las cuales darán lugar más adelante a la aparición de la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE). Esto depende de las divisiones simétricas y asimétricas que padecen las células internas en el estadio de mórula (revisado por Zernicka-Goetz *et al.* 2009).

Después de la activación del genoma embrionario empieza un fenómeno importantísimo en la formación del embrión. Es necesario que se aplanen los blastómeros y se unan firmemente entre sí mediante uniones estrechas. Estas uniones se deben a la expresión de E-cadherina, molécula responsable de la formación del estadio de mórula, y por tanto, del mecanismo de compactación (Fig. 2).

En rumiantes, la compactación celular se da entre los estadios de 16-32 células. Cada vez se hace más difícil observar las divisiones celulares entre los blastómeros periféricos, ya que desarrollan unas uniones de membrana estrechas y oclusivas entre ellas (*tight junctions*). En otras especies como en ratón y porcino, esto ocurre en el estadio de 8 células. En este punto, el embrión es una masa compacta de células indiferenciadas y presenta una morfología muy característica: una monocapa de células epiteliales externas e internas. Éstas últimas presentan otro tipo de uniones entre ellas que permiten la comunicación: *gap junctions*.

Como consecuencia inmediata de la compactación se da la polarización o determinación de los blastómeros (Fig.2), produciendo una diferenciación celular (Johnson *et al.* 2004). La conformación espacial de las células determinarán en estadios posteriores la producción de dos grupos celulares con fines distintos, las más externas darán lugar al TE y las internas a la MCI.

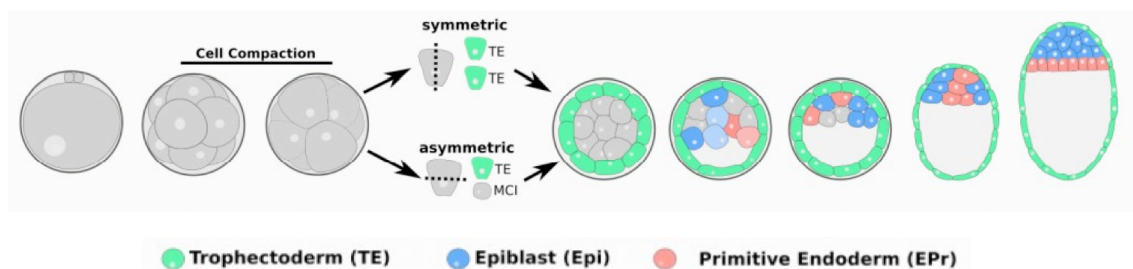


Figura 2 | Compactación y polarización celular en el desarrollo embrionario preimplantacional. La MCI después de la implantación se diferencia en dos tipos celulares: epiblasto e hipoblasto (en ratón conocido como endodermo primitivo). *Project Epiblast/Primitive Endoderm specification and differentiation during early mouse development, PI: Michel Cohen-Tannoudji. www.research.pasteur.fr*

En este trabajo hemos analizado el potencial de los blastómeros a generar diferentes tipos celulares. Esto se conoce como la capacidad de una célula de ser totipotente, pluripotente o multipotente. Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario hasta el estadio de mórula en pequeños rumiantes, todas las células son totipotentes, lo que significa que todas las células tienen el mismo potencial de desarrollo o capacidad de contribuir en la formación de todos los linajes embrionarios y extraembrionarios. Pero a medida que el embrión avanza en su desarrollo, sus células van perdiendo esa capacidad totipotente. Durante el estadio de mórula las células internas se convierten en pluripotentes, es decir, solo pueden contribuir a la formación del feto propiamente dicho pero no a las células formadoras de las futuras capas extraembrionarias.

2. 1. 3. Diferenciación celular.

La última transición es donde se forma el estadio de blastocisto con la consecuente diferenciación total de los dos linajes celulares. Es donde observamos la transición de las células totipotentes a pluripotentes.

Independientemente de la polarización, existe otro mecanismo que también participa en esta determinación. En el estadio de mórula, empieza la expresión y/o restricción de ciertos genes que ayudan a diferenciar el TE e MCI.

Dos pasos consecutivos de diferenciación conducen a la formación del blastocisto, y la formación del TE y de la MCI (Ralston y Rossant 2005). Como indica su nombre, la MCI se posiciona en el interior del blastocisto y sus células retienen la pluripotencia. Por el contrario, las células externas se desarrollan a TE y pasan de ser pluripotentes a multipotentes (Fig. 3)

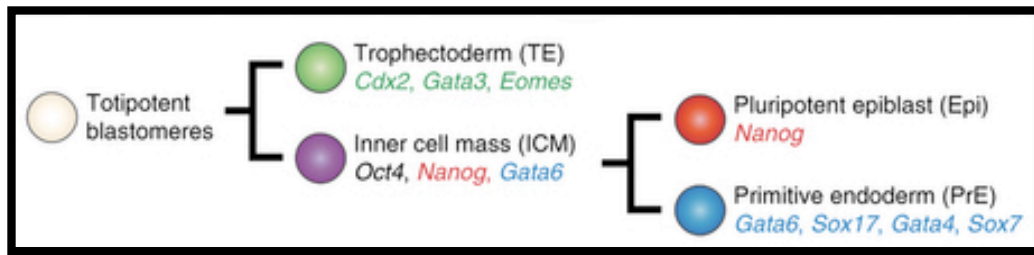


Figura 3 | Genes cruciales para la segregación de los linajes celulares. Existen dos segregaciones importantes en el desarrollo embrionario que dará lugar a los tres linajes celulares: TE, epiblasto e hipoblasto. . Czechanski *et al.* 2014.

2. 1. 3. 1. Primera segregación.

Esta es la primera decisión que toma el embrión para el destino de sus células y da lugar a la aparición de dos linajes celulares. Las células no polarizadas formarán la MCI, y estas constituirán el embrión propiamente dicho. Tienen la posición interna y no están diferenciadas, por tanto, son las células pluripotentes que hablábamos anteriormente (revisado por Zernicka-Goetz *et al.* 2009). El TE, formará las membranas accesorias (nutritivas y protectoras) que rodean al embrión. Son las células de la capa externa y son polarizadas con una parecido enorme a las células epiteliales y de hecho, formarán el primer epitelio que separará el embrión de lo demás, son las denominadas membranas extraembrionarias.

Johnson *et al.* 2004; Rossant 2004 identificaron varios genes que son cruciales para la segregación de células para la futura formación de la MCI y el TE. También implica la expresión de genes que codifican factores de transcripción, como Oct4, Cdx2 y Nanog (Fig. 3).

◆ **Factores de transcripción.**

Es en el estadio de mórula tardía se expresan los genes Oct4 (factor de transcripción de pluripotencia) para dar la MCI, y Cdx2 (factor de transcripción de diferenciación), para dar el TE.

Han sido identificados varios genes que promueven el destino de las células que forman el TE (Strumpf *et al.* 2005). Uno de estos genes se transcribe en la proteína **Cdx2**, la cual es crucial para la segregación del MCI y TE en el estadio de

blastocisto, aunque se sugiere que Cdx2 es el primer inductor del TE en el estadio de mórula tardía.

Cdx2 invalida la expresión de Oct4 en el TE y esto sugiere la inhibición mutua entre Cdx2 y Oct4, ya que Oct4 inhibe a Cdx2 en la MCI. Ambos son descritos en los núcleos de los blastómeros en embriones de 8 células en ratón (Niwa *et al.* 2005; Ralston *et al.* 2005). Con ausencia de Oct4 (Nichols *et al.* 1998) y/o Cdx2 (Chawengsaksophak *et al.* 1997), el embrión muere antes de la implantación ya que no se formaría la MCI ni el TE.

Hay algunas especies como el conejo y el bovino donde las proteínas Oct4 y Cdx2 se encuentran simultáneamente en las células del TE, y este hecho indica que estas dos proteínas no necesariamente se reprimen entre sí, como ocurre en los embriones de ratón (Niwa *et al.* 2005).

El factor de transcripción **Oct4** (o POU5f1) (Niwa *et al.* 2000) se expresa en todo el embrión temprano hasta la fase de blastocisto y su expresión se restringe a la MCI en ratón (Palmieri *et al.* 1994). La expresión de Oct4 en embriones de bovino y porcino no está limitada a la MCI (van Eijk *et al.* 1999; Kirchhof *et al.* 2000), esto sugiere que los mecanismos para la segregación de los linajes tempranos son diferentes entre especies (Kuijk *et al.* 2008).

Oct4 es un factor de pluripotencia, pero se ha descrito su incapacidad de mantener las células madre pluripotentes en ausencia del factor inhibidor de leucemia (LIF). Esto indica que hay otros factores de pluripotencia necesarios, como podría ser el Nanog.

El factor de transcripción **Nanog** fue descubierto en 2003 en embriones de ratón por Chambers *et al.* Es una proteína homeodominio divergente que se expresa exclusivamente en la MCI de blastocistos, en las células madre embrionarias (ESCs) y en las células germinales embrionarias (EGCs) en ratón y humano (Hart *et al.* 2004). Está presente en varias líneas celulares pluripotentes en humano y ratón, y ausente en células somáticas.

Chambers *et al.* (2003) no encontró expresión de Nanog en embriones de ratón durante los estadios embrionarios iniciales en la segmentación, la primera señal de

mRNA Nanog es en la mórula compacta. En los embriones preimplantacionales, su expresión se restringe a las células fundadoras de las células madre embrionarias (MCI) y no existe en el TE. La expresión temprana de Nanog está regulada negativamente durante la diferenciación de las células madre embrionarias, consiste en una asociación íntima con la identidad de células madre pluripotentes (Chambers *et al.* 2003). Baja la expresión de Nanog en las células P19, que provienen y postulan parecerse a las células del estadio de blastocisto expandido (Chambers *et al.* 2003).

Los transcritos de Nanog aparecen como una onda temporal con niveles máximos entre la mórula tardía y el blastocisto intermedio, con disminución de expresión antes de la implantación de ratón (Chambers *et al.* 2003). El RNAm Nanog, además, está presente en las células germinales primordiales en la cresta gonadal de embriones de E 11.5 en ratón. Las mismas células que pueden ser reprogramadas para ser células germinales embrionarias (Resnick *et al.* 1992).

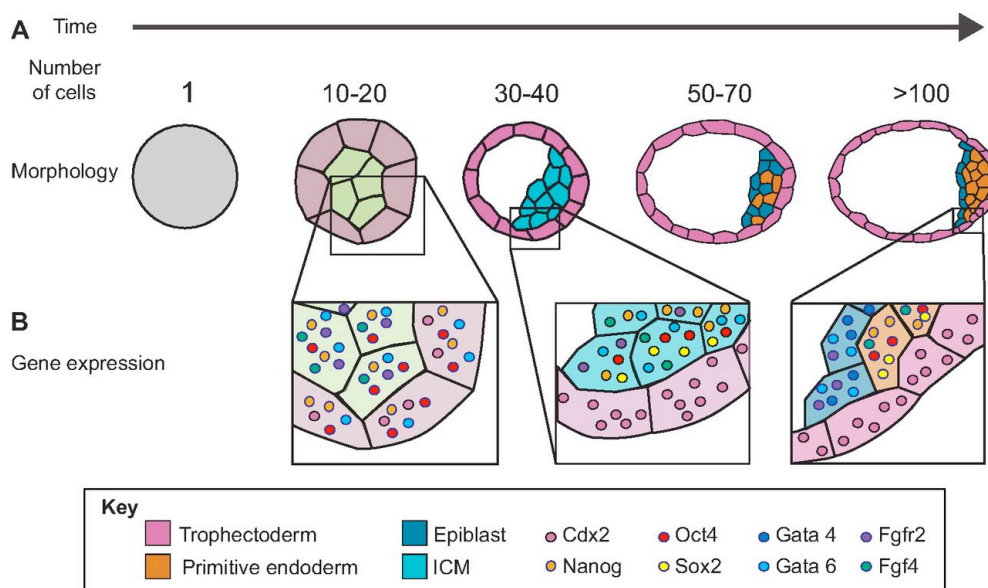


Figura 4 | Etapas y actividad molecular asociados al desarrollo embrionario temprano en ratón. (A) Se indican el número de células aproximadas en cada etapa. Las primeras diferencias entre los blastómeros se observan entre los estadios de 8 a 16 células. Las células situadas en el exterior (rosa) son las implicadas en la formación del TE, mientras que las células internas (azul claro) formaran la MCI. (B) Expresión de genes relacionados con la segregación de los linajes celulares durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Martínez-Arias *et al.* 2013.

La expresión de Oct4 en mamíferos, según Pesce y Schöler (2001), tiene efecto sobre los oocitos, embriones iniciales y blastocistos eclosionados, es decir, tanto

antes como después de la ventana de donde derivan las células madre. Aunque los factores de transcripción Oct4 y Nanog se co-expresan, aparecen en vías paralelas, ya que la pérdida de Nanog no afecta a la expresión de Oct4 en el blastocisto en ratón, ni al contrario (Chambers *et al.* 2004).

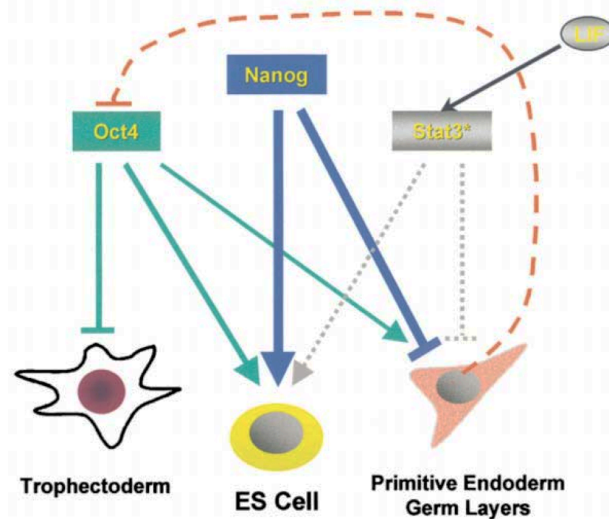


Figura 5 | Esquema de factores de transcripción en células madre embrionarias. Chambers *et al.* 2003. Oct4 y Nanog son esenciales para la identidad de las células madre embrionarias, mientras que Stat3 tiene una función accesoria.

Fue inducida inicialmente la capacidad de pluripotencia a fibroblastos de bovinos adultos (Sumer *et al.* 2014), a través de la expresión ectópica de Oct4. Estos no son suficientes para inducir la pluripotencia a estos fibroblastos. Añadir el factor de transcripción Nanog fue la clave para la regulación de la pluripotencia y la inducción estable de los fibroblastos de bovinos adultos. Es esencial para generar clones de células madre pluripotentes inducidas más estables en bovino, obtenidas tanto en *in vitro* como *in vivo*.

El desarrollo embrionario preimplantacional en mamíferos muestra notables diferencias entre las especies. Posiblemente influye el mecanismo de segregación del TE, y la formación de las células pluripotentes. Estudios realizados en bovino y porcino (Kuijk *et al.* 2008) no detectaron la proteína Nanog mediante inmunofluorescencia en blastocistos de cerdo. Este hecho sugiere que Nanog no tienen un papel importante en embriones de porcino en este momento del desarrollo (Kumar *et al.* 2007). Tampoco hay señal en mórulas y blastocistos producidos *in vivo*.

Por otro lado, Kuijk *et al.* (2008) observó que Nanog en embriones de bovino tiene una distribución heterogénea en la MCI de blastocistos y se asemeja a los

embriones de ratón (Chazaud *et al.* 2006). Sugiere una función conservadora de este gen entre especies. Se vio que algunas células de la MCI de embriones *in vitro* de bovino, tenían expresión de proteína Nanog, pero otras células eran negativas (Kuijk *et al.* 2008). Esto nos sugiere un papel de Nanog diferente que en los embriones de porcino, ya que indica que hay células de la MCI con expresión de Nanog que serán el futuro epiblasto y las que no tienen señal serán el hipoblasto.

Analizando la expresión de la proteína Nanog en cabras adultas (He *et al.* 2006) se halló una expresión distinta de otras especies. Se ha descrito señal de la proteína Nanog en los núcleos de embriones de 8-16 células producidos *in vivo*. En las células de la MCI de mórulas y blastocistos, aparece localizada en los núcleos principalmente, su patrón de tinción está localizado en nucleoplasma y nucléolo de las células de la MCI. En blastocistos jóvenes los niveles de Nanog en las células de TE son atenuados en el nucleoplasma, hasta ser desplazados completamente a una señal en nucléolo en blastocistos expandidos. Así finalmente en TE tenemos señal en nucléolo únicamente, a diferencia del marcaje en ratón (que actúa como modelo), donde la proteína Nanog solo se encuentra en las células de la MCI y la localización nucleolar no ha sido descrita (Hatano *et al.* 2005).

En estudios posteriores con embriones de cabra Xiao-li *et al.* (2015) se observó que hay un periodo de bloqueo de la proteína Nanog hasta el estadio de 8 células donde incrementa gradualmente hasta llegar a la formación de mórula y blastocisto en embriones *in vivo* e *in vitro*, y mientras tanto, los niveles de expresión en embriones *in vivo* (fecundados) es mayor que en embriones *in vitro* (partenogenéticos). Describe el patrón de expresión de Nanog también en embriones de cabras *in vivo* producidos mediante fecundación *in vitro* comparando con embriones partenogenéticos producidos *in vitro* (Xiao-li *et al.* 2015). En los embriones *in vivo*, la inmunofluorescencia en un inicio fue localizada principalmente en el citoplasma de embriones de 2 células, disminuyendo en 4 células, y fue localizada en el núcleo de cada blastómero en embriones de 8 células y mórulas. A partir de entonces se detecta en cada blastómero del estadio de blastocisto en citoplasma y núcleo. Este patrón de expresión es similar al descrito anteriormente con embriones de cabras (He *et al.* 2006).

En embriones partenogénéticos, la inmunofluorescencia se detecta en todas las etapas del desarrollo embrionario preimplantacional, desde 2 células hasta el estadio de blastocisto de cabras (Xiao-li *et al.* 2015). En los embriones desarrollados hasta mórulas, la expresión de Nanog se limita a los núcleos de cada blastómero, en comparación con la expresión de embriones de 2 células a 6 células que se sitúa difusamente en citoplasma. Tanto en embriones producidos *in vivo* como *in vitro*, Nanog se detecta en las células de la MCI como en las del TE. Resultados similares a los conseguidos anteriormente en bovino (Keefer *et al.* 2007).

Recientemente varios grupos de investigación han demostrado que el desarrollo embrionario y la pluripotencia muestran diferentes regulaciones debido a los genes de origen materno o del propio cigoto. El establecimiento de la totipotencia no se ve afectada por la eliminación del Oct4 materno utilizando un enfoque genético, tanto Oct4 como la proteína Nanog tienen expresión en MCI (Wu *et al.* 2013).

Estudios previos describen diferentes parámetros que se han utilizado para evaluar la calidad embrionaria y su desarrollo. Por ejemplo, la morfología embrionaria, la cronología del desarrollo, la determinación de las tasas de eclosión de la zona pelúcida, la presencia de la MCI, el número total de células en blastocistos, etc. También, la comparación de la expresión génica entre embriones producidos *in vivo* e *in vitro* puede ofrecer mucha información acerca de la competencia y calidad embrionaria (Purpera *et al.* 2009). Además, en nuestro laboratorio analizamos la calidad embrionaria mediante la prueba de criotolerancia de blastocistos (revisado por Rizos *et al.* 2008; Kuwayama *et al.* 2005; Leoni *et al.* 2008), que es un método no invasivo, aunque provoca múltiples daños celulares osmóticos, oxidativos o lesiones debidas a la formación de cristales de hielo.

Por otro lado, el mejor criterio para evaluar la calidad de embriones partenogénéticos es la capacidad que tienen para someterse al desarrollo preimplantacional y postimplantacional. Actualmente, también se utilizan las

técnicas de análisis de expresión de RNAm para observar las diferencias entre los embriones fecundados y los partenogénéticos (Naturil-Alfonso *et al.* 2011).

Nuestro equipo, utiliza la tinción diferencial (Thouas *et al.* 2001) para evaluar estas diferencias, sirve para ubicar en posición la MCI y el TE en el estadio de blastocisto. En este estudio utilizaremos la detección por inmunofluorescencia de algunos marcadores específicos, así podremos distinguir los diferentes tipos celulares durante todos los estadios del desarrollo preimplantacional. Nos interesan diferenciar aquellas células pluripotentes de las que ya han perdido esta capacidad que son las multipotentes que forman el TE, y más concretamente en el estadio de blastocisto, hacer un recuento celular de la MCI (pluripotentes).

En la comparación de modelos de embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* y partenogénéticos (Gómez *et al.* 2009). Se observó una reducción significativa en los recuentos celulares del TE de los embriones partenogénéticos, pero una proporción similar de células de la MCI así como una relación de MCI/células totales parecida entre embriones fecundados *in vitro* y partenogénéticos. También se analizaron por métodos de RT-PCR en los grupos de blastocistos expandidos de día 8, y se vio que los embriones partenogénéticos tenían una disminución en los genes Oct3/4 a diferencia de los fecundados *in vitro*.

Ya hemos visto que se pueden esperar diferencias en el análisis de genes y expresión de las proteínas entre los embriones fecundados *in vitro* y los partenogénéticos, pero esto depende de la especie y el marcador elegido para la evaluación.

En resumen, con este trabajo se pretende optimizar los protocolos de inmunodetección para poder evaluar los patrones de expresión de las proteínas Nanog y Cdx2 en embriones preimplantacionales obtenidos mediante fecundación *in vitro* y activación partenogénica de hembras prepúberes de ovino y caprino. La finalidad es evaluar el mejor marcador que nos permita diferenciar entre las células pluripotentes y las multipotentes, que son las del TE, y por último, utilizar el recuento de células para comparar entre los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* y partenogénéticos.

Capítulo 3:

OBJETIVOS.

OBJETIVOS.

1. La optimización del protocolo de inmunodetección de proteínas específicas (Nanog) en embriones preimplantacionales de 2 a 8 células, mórulas y blastocistos producidos *in vitro* por fecundación *in vitro* (FIV) y activación partenogenética (AP) en ovino y caprino.
2. Estudiar en embriones preimplantacionales de 2 a 8 células, mórulas y blastocistos, el momento y localización de la señal de la proteína Nanog.
3. Comparar el número de células con expresión de la proteína Nanog entre los distintos tipos embrionarios de ovino y caprino producidos mediante FIV y partenogénesis.

Capítulo 4:

Material y Métodos.

4.1. Producción in vitro de embriones:

4.1.1. Recogida y selección de oocitos

En nuestro caso, los oocitos provienen de ovarios de hembras prepúberes (aproximadamente de 3-4 meses de edad en ovejas y 1-2 meses en cabra) sacrificadas en matadero.

Los ovarios se recogen de un matadero comercial de la zona en un tiempo máximo de una hora, en medios de PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma P4417) + 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (G3632) a una temperatura de 37-38°C. Una vez en el laboratorio se hacen tres lavados con solución de PBS limpia a 37°C y se mantienen en la estufa a 37°C hasta su uso.

El método utilizado para la extracción de oocitos es el slicing (Martino *et al.* 1994). Para la realización de esta técnica, los ovarios se colocan en placas de cultivo con medio TCM 199, con HEPES (M2520) suplementado con 2,2 g/L de bicarbonato y 20,5 mg/L de gentamicina (osmolaridad 280-300 mOsm).

Seleccionamos los complejos cúmulus-oocito (COCs) que sigan las siguientes características: dos o más capas completas de células del cúmulus no expandidas, diámetro oocitario grande y citoplasma homogéneo.

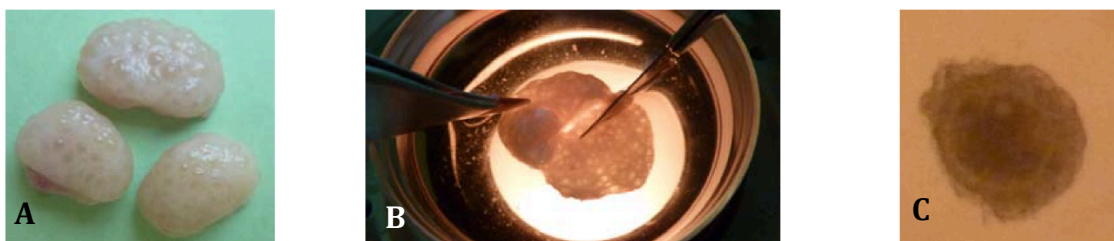


Fig. 6 | Ovarios de hembra caprina prepúber, técnica de slicing y COCs seleccionado. (A) ovarios sin folículos dominantes. **(B)** técnica de slicing para obtener oocitos. **(C)** COCs seleccionados para la maduración y fecundación in vitro.

4.1.2. Maduración in vitro.

Se procede al lavado de los COCs seleccionados por tres veces. Después se colocan en una placa de cultivo con medio TCM 199 (M4530) suplementado con 275 µl/ml de piruvato de sodio, 146 µl/ml de L-glutamina, 50 µl/ml de Gentamicina, 10 % (v/v) de Suero Fetal Bovino (SFB, Life Technologies), 10 µl/ml de o- LH, 10 µl/ml de o-FSH, 1 µl/ml de β-estradiol y 7,7 µl/ml de Cistiamina.

La maduración de los oocitos se hace en placas de cultivo embrio-testadas, dispuestos en tres gotas de 100 µl, en grupos de 30-35 COCs en cada gota de medio MIV cubierto con aceite mineral e incubados 24 horas a 38,5°C en una atmosfera del 5% de CO₂ en aire y máxima humedad.

Las placas de maduración deben prepararse con una mínimo de tres horas de antelación para que se calibre el medio MIV con los gases del incubador.

4.1.3. Capacitación de los espermatozoides y Fecundación in vitro.

Después de las 24 horas de maduración, los oocitos son fecundados con semen fresco recolectado mediante vagina artificial de dos machos de la raza Lacaune de fertilidad probada. En el caso de cabra utilizamos tres machos de la raza Murciano-Granadina de fertilidad probada. Es transportada al laboratorio a 35-37°C en un tiempo de 1- 1:30 horas.

En ovino para seleccionar la fracción más móvil de espermatozoides se utiliza *Ovypure density gradient* (nidacon EVB S.L., Barcelona, España). Se deposita 2 ml de *Bottom layer* (80%), después otros 2 ml de *Top layer* (40%) y en la superficie 200-400 ml del pool de semen. Centrifugamos 25 minutos a 300 rpm y eliminamos el sobrenadante, para quedarnos con el semen de la base del tubo.

En caprino utilizamos el método *swim-up* (Parrish *et al.* 1986) para seleccionar la fracción más móvil de espermatozoides. Depositamos 90 µl de semen en el fondo de los tres tubos que contienen 2 ml de medio definitivo mDM (Brackett *et al.* 1975, modificado por Younis *et al.* 1991). Se hace la incubación de una hora a 38'5°C en una atmosfera de 5% de CO₂ en aire y máxima humedad. Después se recupera la parte superior del sobrenadante de cada uno de los tubos (que

contiene los espermatozoides más móviles), se depositan en un tubo estéril de 15 ml y se centrifuga a 1000 rpm durante 3 minutos. Para inducir la capacitación de los espermatozoides se resuspende el pellet obtenido después de la centrifugación en proporción 1:1 (v/v) en medio mDM suplementado con heparina a una concentración final de 50 µg/ml (heparina sódica, H3149-100KU) y se incuba 45 minutos con las condiciones descritas anteriormente.

Cuando ya tenemos el semen seleccionado en ovino, fecundamos los oocitos con una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml. Colocamos los oocitos ya madurados, parcialmente desnudados mediante pipeteo, en una placa de cultivo dispuestos en grupos de 15 oocitos máximo por gota de 100 µl de medio SOF (fluido oviductal sintético) (Holm *et al.* 1999), con un 10% o 20% de SOC (suero de oveja en celo) para capacitar el semen. Incubamos durante 17-20 horas a 38,5°C, en una atmosfera de 5% de CO₂ y 5% de O₂, y máxima humedad.

En el caso de caprino, una vez tenemos el semen seleccionado, fecundamos los oocitos con una concentración final de 4×10^6 espermatozoides/ml. Colocamos los oocitos ya madurados, parcialmente desnudados, en una placa de cultivo dispuesto en grupos de 15 oocitos máximo por gota de 100 µl de medio TALP (medio Tyrode's modificado, Parrish *et al.* 1986), suplementado con 1 µg/ml de hipotaurina (H-1384) y 0'3 mg/ml de glutatión (G-1986). Incubamos durante 17-20 horas a 38'5°C en una atmosfera de 5% de CO₂ en aire y humedad máxima.

4.1.4. Activación partenogenética.

Los oocitos madurados son desnudados completamente mediante un suave pipeteo. Son activados en medio PBS con 10% de SFB y 2% de antibiótico en una placa de cuatro pocillos. Se deja un grupo de 10-20 oocitos en el mPBS durante unos minutos para que se habitúe, después lo pasamos al siguiente pocillo donde hemos añadido 1 µl de Ionomicina por cada 1ml de mPBS, durante 4 minutos. Después de esto, comienza la activación de los oocitos. Los pasamos por dos lavados de mPBS antes de incubarlos durante 3-3.30h en gotas de 100 µl, suplementado con 1 µl de 6-DMAP por cada 100 µl de TCM 199, con 10% de SFB y 2% de antibiótico.

Después de la AP, los presuntos cigotos son cultivados in vitro durante 8 días con medio SOF, en una atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, a 38'5°C y máxima humedad.

4.1.5. Cultivo de embriones in vitro.

A las 17-20 horas postfecundación los presuntos cigotos son denudados completamente mediante un suave pipeteo. Se realizan tres lavados para poder desprenderlos de los espermatozoides. Se trasladan a las placas de cultivo con medio SOF (Tervit et al., 1972; modificado por Takahashi et al., 1992), dispuesto en grupos de 10 cigotos máximo en microgotas de 10 µl (1 oocito/µl SOF) , cubiertas de aceite mineral.

Se dejan durante 8 días en una atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, a 38'5°C y máxima humedad. A las 48 horas postinseminación (24 h postcultivo), se evalúa la tasa de división de los embriones. Al quinto día postcultivo, se cambian los embriones a una placa con nuevo medio SOF para renovar los nutrientes. Finalmente, finalizados los 8 días de cultivo se hace un recuento del número de blastocistos (y mórulas) presentes en cada grupo.

4.2. Análisis Inmunocitoquímico de las proteínas Nanog y CDX2:

Preparamos tanto los embriones FIV como los AP, y en los diferentes estadios del desarrollo preimplantacional: 2 a 4 células, mórulas y blastocistos para la inmunodetección posterior.

Los embriones son fijados con paraformaldehído al 4% (v/v) (PFA) durante 10-15 minutos a temperatura ambiente, seguidamente se permeabilizan con 0,1% (v/v) de Tritón X-100 en PBS más 0,2% de azida sódica durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después podemos dejarlos hasta realizar la tinción en solución stock, preparada con 0,01% (v/v) de Tween 20 y 0,2% de azida sódica en PBS. Los embriones pueden permanecer en esta solución stock hasta 3 meses sin perder su integridad. Utilizamos placas de cuatro pocillos para realizar los pasos descritos anteriormente, haciendo grupos de 15 embriones máximo en cada solución.

Para empezar la inmunodetección propiamente dicha, los embriones se bloquean 2 horas a temperatura ambiente con cámara húmeda en la placa. La solución de bloqueo es PBS suplementado con 1% (wt/vol) de BSA (*bovine serum albumin*), 0,05% (v/v) de Tween 20 y 0,2 % de azida sódica. Después se procede a la tinción simultánea de todas las muestras para reducir la variabilidad experimental.

Para detectar la proteína Nanog primeramente incubamos los embriones con una dilución de 1:400 en ovejas y 1:600 en cabras de anticuerpo primario *rabbit anti-Human Nanog* (cat. No. 500-P236, Preprotech, Rocky Hill, NJ) durante toda la noche a 4°C. Después incubamos los embriones en *goat anti-Rabbit Alexa Fluor 594* como anticuerpo secundario (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, España), durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

En el caso de la dobles inmunodetección de Cdx2 y Nanog en blastocistos. Incubamos antes con Cdx2 durante toda la noche con cámara húmeda en dilución 1:100 con *mouse monoclonal anti-Cdx2* como anticuerpo primario (BioGenex, Fremont, CA, USA). El siguiente paso es la incubación con el anticuerpo secundario durante 3 – 5 horas en RT con *chicken anti-Mouse Alex Fluor 488* (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, España).

En todos los embriones teñimos el DNA con 0,25 % *Hoechst 33258* (Invitrogen) antes de montar las muestras en el portaobjetos en una microgota de *Vectashield* (Vector Laboratories, Peterborough, UK) después los cubrimos con cubreobjetos.

Todas las muestras fueron examinadas con microscopio de epifluorescencia Olympus Bx41 (Olympus, Hospitalet del Llobregat, España) equipado con los filtros específicos, y las imágenes correspondientes a los embriones se capturaron mediante el sistema de captura y procesamiento de imágenes Genus.

Para cada anticuerpo, las imágenes fueron adquiridas con los mismos tempos de exposición y valores para todos los embriones y se analizaron con el software ImageJ para el recuento de células y cuantificación de la fluorescencia. El recuento del total de células se hace con la tinción de Hoechst (filtro DAPI) y el recuento de células con expresión Nanog con la tinción de la proteína Nanog (filtro Texas Red).

4.2.1 Localización e Intensidad de la expresión de la proteína Nanog.

En la inmunocitoquímica de la proteína Nanog podemos observar que existen diferentes intensidades y localizaciones en los embriones producidos por FIV y AP en los distintos estadios tanto de oveja como de caprino.

La primera diferenciación de la localización que puede observarse en las células embrionarias es en núcleo y citoplasma. Normalmente la señal en núcleo se distingue más intensa que en citoplasma como podemos observar en la Fig. 7.

Existe una señal más específica de la proteína Nanog dentro de los núcleos de los blastómeros. Esta expresión se distingue por una señal más intensa en los núcleos y más débil en el nucleoplasma (Fig. 8).

Otra diferencia en la expresión de la proteína Nanog que podemos observar indistintamente en los embriones de ovino y caprino es la intensidad de la señal. Podemos distinguir como hay núcleos con más intensidad que otros (Fig. 9).

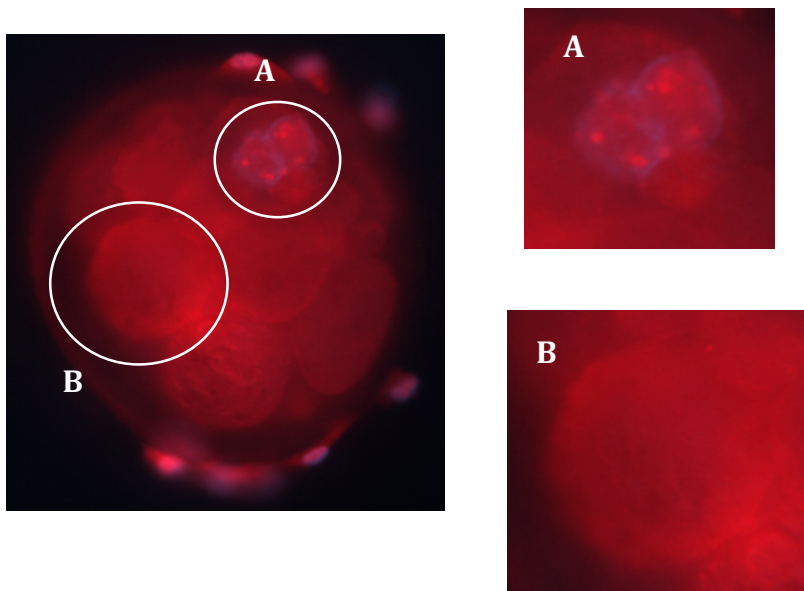


Fig. 7 | Localización de la expresión de la proteína Nanog. (A) Observamos señal nuclear en uno de los blastómeros. **(B)** Existe señal citoplasmática de la proteína Nanog.

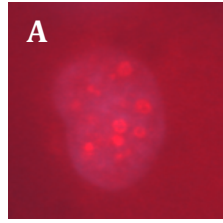
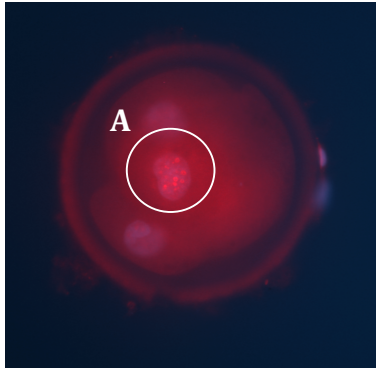
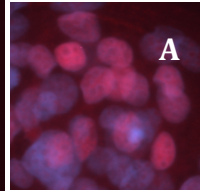
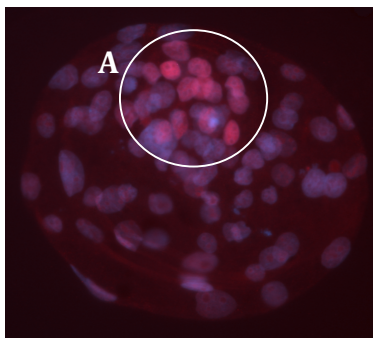
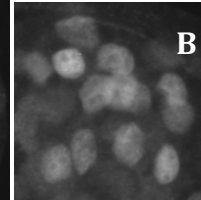
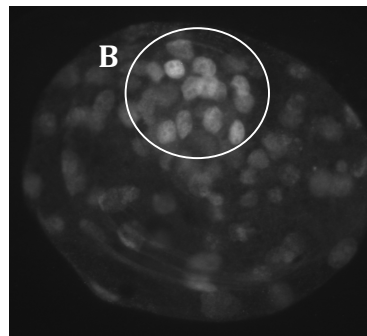


Fig. 8 | Localización nuclear: nucléolo y nucleoplasma. (A) Se observa una señal más intensa en los nucléolos de los dos blastómeros centrales del embriones de 4 células.



Merge



hNANOG

Fig. 9 | Intensidad se la expresión de la proteína Nanog. (A) Observamos la imagen de Merge de un blastocisto como hay núcleos de algunos blastomeros con señal más intensa (circulo blanco) comparado con las demás células. **(B)** Observamos la misma imagen de la tinción de Nanog con los núcleos de algunos blastómeros más intensos en su señal.

Capítulo 5:

Resultados.

5.1. Producción de embriones in vitro.

5.1.1. Producción de embriones ovinos

Un total de 1869 oocitos fueron puestos a madurar. De estos, se utilizaron 1723 oocitos para la valoración de la maduración nuclear (MII); para la FIV se utilizaron 640 oocitos para la FIV (en 12 repeticiones) y en la AP se utilizaron 1083 oocitos (en 15 repeticiones) (Tabla 1). Estos tratamientos están descritos en la sección de Material y Métodos.

Del total de embriones fecundados, 134 fueron usados para la valoración de pronúcleos con la tinción de orceína. Así que se cultivaron *in vitro* 506 embriones en FIV.

Del total de embriones cultivados (en CIV) utilizamos 35 en los estadios de 2 a 8 células para la inmunodetección de la proteína Nanog para FIV y 40 embriones de 2 a 16 células para AP.

5.1.2. Producción de embriones caprinos

Un total de 279 oocitos fueron puestos a madurar. De estos, se utilizaron 271 oocitos para la valoración de la maduración nuclear (MII); para la FIV se utilizaron 205 oocitos (en 2 repeticiones) y la AP se utilizaron 66 oocitos (en 1 repetición) (Tabla 1). Estos tratamientos están descritos en la sección de Material y Métodos. En este caso no se realizó la valoración de pronúcleos.

Del total de embriones cultivados (en CIV) utilizamos 35 en los estadios de 2 a 8 células para la inmunodetección de la proteína Nanog de FIV y 10 embriones de 2 a 8 células de AP.

Tabla 1| Resultados de la producción in vitro de embriones de ovino y caprino.

| | Tto | Oocitos fecundados (n) | Divididos (%) | Mórulas | | Blastocistos | |
|---------------|-----|------------------------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | | | | /totales, n (%) | /divididos (%) | /totales, n (%) | /divididos (%) |
| OVEJAS | FIV | 506 | 235 (46'4%) | 96 (20'4%) | 96 (40'9%) | 20 (4'3%) | 20 (8'5%) |
| | AP | 1083 | 643 (59'4%) | 237 (22'7%) | 237 (36'9%) | 13 (1'3%) | 13 (2%) |
| CABRA | FIV | 205 | 156 (76'1%) | 30 (17'7%) | 30 (19'23%) | 31 (18'24%) | 31 (19'9%) |
| | AP | 66 | 49 (74'2%) | 16 (28'6%) | 16 (32'7%) | 21 (37'5%) | 21 (42'9%) |

Detalle de los resultados obtenidos en la FIV y AP en ovino y caprino durante el estudio realizado. Los porcentajes observados de mórulas y blastocistos por el número total de oocitos son obtenidos teniendo en cuenta los embriones de 2 a 16 células utilizados para la inmunodetección de la proteína Nanog.

5.2. Optimización del protocolo de inmunodetección y localización de los factores de transcripción Nanog y Cdx2.

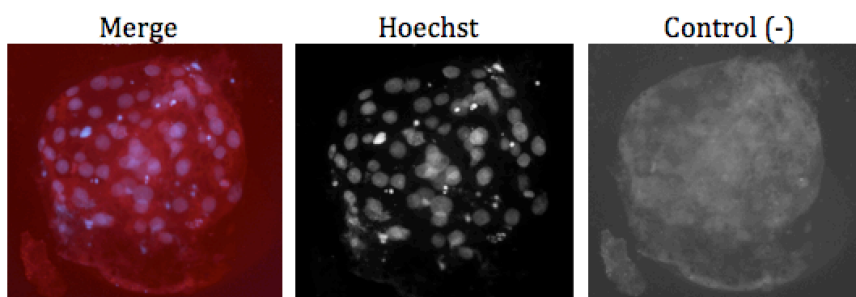


Fig. 10 | Control (-) en blastocistos AP de cabra. No hay señal inespecífica del anticuerpo secundario.

Se realizó un control negativo en blastocistos de cabra obtenidos mediante AP (Fig. 10). El anticuerpo secundario *Alexa Fluor 594* utilizado inicialmente para las inmunodetecciones con *Oct4* y *rabbit polyclonal anti-Nanog*. No hay expresión inespecífica como puede observarse en la Fig.1.

5.2.1. Nanog.

La proteína Nanog en ratón es un buen marcador de la pluripotencia de las células de la MCI y por lo tanto marcará estas células y no las del TE. La inmunodetección de esta proteína será objeto de nuestro estudio.

Para la puesta a punto de esta tinción utilizamos el protocolo empleado para embriones de ratón en el Departamento de Biología Celular y Fisiología de la UAB. Este protocolo consistía en el descrito en la sección de Material y Métodos utilizando el anticuerpo primario *rabbit polyclonal anti-Nanog* (Fig. 11). Pero no funcionó en embriones de cabras y ovejas, así que se hicieron muchas variaciones del protocolo inicial, como puede verse en la Tabla 2.

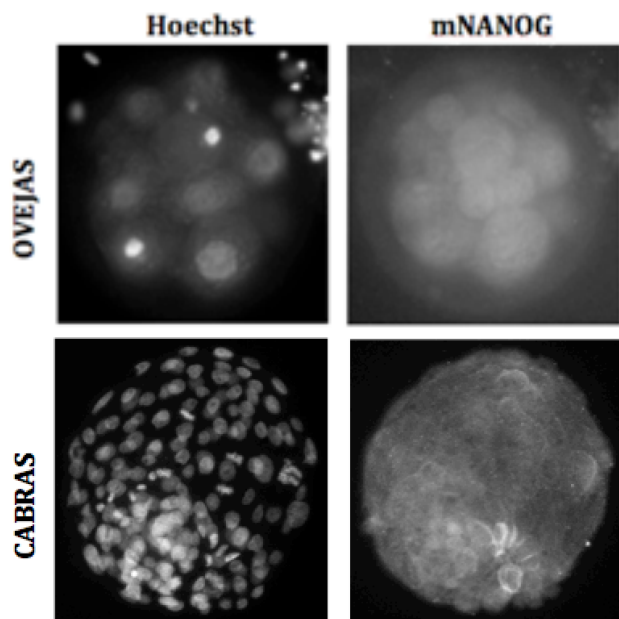


Fig. 11 | Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas de FIV y AP en ovino y caprino.

No hay señal específica de mouse anti-NANOG (abcam ref: ab80892).

En las mórulas de oveja observamos una interacción con la tinción Hoechst, no puede unirse correctamente a los núcleos de los blastómeros.

Empezamos las variaciones del protocolo disminuyendo el tiempo de exposición a la solución de bloqueo inicial. Antes era durante toda la noche (ON) y se cambió a sólo 2 horas, la duración mínima recomendada por el Departamento de Biología Celular. El siguiente paso fue aumentar la concentración de anticuerpo primario, de [1:200] inicialmente a [1:150] y [1:100]. Y por último, aumentamos su tiempo de exposición del anticuerpo, tanto primario como secundario, durante toda la noche a 4°C para poder obtener una unión más específica y estable. Pero a pesar

de todas estas pruebas no obtuvimos una expresión nítida y clara en ninguno de los embriones teñidos. Así que siguiendo el protocolo encontrado en He *et al.* (2006), decidimos probar con el anticuerpo *rabbit anti-human Nanog*, que ha dado resultados en embriones caprinos mucho mejores.

Tabla 2| Variaciones del protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog en embriones de ovino y caprino.

| Protocolo 1: Oct4 y NANOG. | | | | |
|--|------------|------------|---------|--------------|
| Bloqueo ON 4 ^o C; <u>rabbit anti-OCT4</u> (Santa-Cruz Biotechnology, ref: sc-9081) [1:50]/ <u>rabbit polyclonal anti-NANOG</u> (abcam, ref: ab80892) [1:200] 1:30h RT; <u>anti-rabbit Alexa Fluor 594</u> (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloqueo, 30 minutos | | | | |
| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
| 16 Mórulas oveja FIV | 10 | 0 | 0 | 0% |
| 10 Blastocistos cabra PA | 6 | 5 | 0 | 0% |
| Protocolo 2: Oct4, NANOG y Control (-). | | | | |
| Bloqueo ON 4 ^o C; <u>rabbit anti-OCT4</u> (Santa-Cruz Biotechnology, ref: sc-9081) [1:50]/ <u>Rabbit polyclonal anti-NANOG</u> (abcam, ref: ab80892) [1:200] 1:30h RT; <u>anti-rabbit Alexa Fluor 594</u> (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 minutos RT. | | | | |
| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
| 14 Mórulas oveja FIV | 11 | 0 | 0 | 0% |
| 8 Blastocistos cabra PA | 7 | 7 | 0 | 0% |
| Protocolo 3: NANOG. | | | | |
| Bloqueo 2h RT; <u>rabbit polyclonal anti-NANOG</u> (abcam, ref: ab80892) [1:200] 1:30h RT; <u>anti-rabbit Alexa Fluor 594</u> (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 minutos RT. | | | | |
| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
| 10 Mórulas oveja FIV | 8 | 0 | 0 | 0% |
| 11 Mórulas oveja PA | 10 | 0 | 0 | 0% |
| Protocolo 4: NANOG. | | | | |
| Bloqueo 2h RT; <u>rabbit polyclonal anti-NANOG</u> (abcam, ref: ab80892) [1:150] y [1:100] ON 4 ^o C; <u>anti-rabbit Alexa Fluor 594</u> (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 minutos RT. | | | | |
| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
| 6 mórulas oveja FIV | 6 | 0 | 0 | 0% |
| 8 mórulas oveja PA | 7 | 0 | 0 | 0% |

Protocolo 5: Cdx2 y NANOG.

Bloqueo 2h RT; mouse anti-CDX2 (BioGenex) [1:100] ON 4°C; anti-rabbit Alexa Fluor 498 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 3-5 h RT; rabbit polyclonal anti-Nanog (abcam, ref: ab80892) [1:150] ON 4°C; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 minutos RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|--------------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 3 blastocistos cabra FIV | 3 | 3 | 0 | 0% |

Protocolo 6: NANOG.

Bloqueo 30 min RT; rabbit polyclonal anti-NANOG (abcam, ref: ab80892) [1:150] 1 h RT; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 1 h RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|---------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 11 mórulas oveja PA | 0 | 0 | 0 | 0% |

Protocolo 7: Cdx2 y NANOG. Ag Retrieval

Bloqueo 2h RT; mouse anti-CDX2 (BioGenex) [1:100] ON 4°C; anti-rabbit Alexa Fluor 498 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 3-5 h RT; rabbit polyclonal anti-NANOG (abcam, ref: ab80892) [1:100] 1:30 h RT; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 min RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|-------------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 9 blastocistos cabra PA | 7 | 7 | 0 | 0% |

Protocolo 8: NANOG.

Bloqueo 30 min RT; rabbit polyclonal anti-NANOG (abcam, ref: ab80892) [1:300] 1:30 h RT; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 min RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|-------------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 13 mórulas oveja FIV/PA | 12 | 0 | 0 | 0% |

Protocolo 9: NANOG.

Bloqueo ON 4°C/2h RT; rabbit anti-human NANOG (Peprotech, ref: 500-P236) [1:150] y [1:200] 1:30 h RT; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 min RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|--|------------|------------|---------|--------------|
| 30 mórulas oveja PA (6 grupos de 5 mórulas) | 19 | 19 | 12 | 40% |

Protocolo 10: NANOG.

Bloqueo ON 4°C; rabbit anti-human NANOG (Peprotech, ref: 500-P236) [1:200], [1:400] y [1:600] 1:30 h RT; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 min RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|----------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 37 mórulas oveja FIV | 30 | 26 | 8 | 21'6% |

Protocolo 11: NANOG.

Bloqueo 2h RT; rabbit anti-human NANOG (Peprotech, ref: 500-P236) [1:400] y [1:600] 1:30 h RT; anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 min RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|-------------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 5 blastocistos cabra PA | 5 | 5 | 5 | 100% |

Protocolo 12: NANOG.

Bloqueo ON 4º C; *rabbit anti-human NANOG* (PeproTech, ref: 500-P236) [1:400] y [1:600] 1:30 h RT; *anti-rabbit Alexa Fluor 594* (Molecular Probes) 2 µl + 664 µl sol. Bloq 30 min RT.

| Muestra (n) | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
|----------------------|------------|------------|---------|--------------|
| 24 Mórulas oveja PA | 20 | 20 | 5 | 25% |
| 35 Mórulas oveja FIV | 30 | 30 | 9 | 30% |

Detalle de las diferentes variaciones del protocolo inicial para la inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas y blastocistos de oveja y cabra. Número de embriones total inicial (antes de la tinción), los embriones conservados (embriones después de la tinción), valorables (aquellos que preservan la integridad morfológica), y por último, aquellos embriones donde se podía observar señal de Nanog y hacer recuento celular correctamente (n NANOG). La eficacia de la tinción se expresa por el porcentaje de la relación entre el número de embriones iniciales totales y los embriones donde es posible hacer un recuento celular.

Finalmente, el protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog que da mejores resultados consiste en 2 horas de bloqueo a temperatura ambiente, toda la noche de incubación con el anticuerpo primario *rabbit anti-Human Nanog* a 4º C con una dilución de [1:400] en ovejas y [1:600] en cabras, y una incubación con el anticuerpo secundario *anti-rabbit Alex Fluor 594* (Molecular Probes) con dilución 2 µl + 664 µl Solución de Bloqueo durante 30 minutos (Tabla 3). La evaluación de las muestras fue con microscopio de epifluorescencia Olympus Bx41.

Tabla 3 | Protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog en embriones preimplantacionales de ovino y caprino.

| Protocolo 13 : NANOG. | | | | | | | | | | | |
|--|------------|----|------------|------------|---------|--------------|----|------------|------------|---------|--------------|
| Bloqueo 2 h RT; <u>rabbit anti-human NANOG</u> (Peprotech, ref: 500-P236) Oveja [1:400] y Cabra [1:600] ON 4°C; <u>anti-rabbit Alexa Fluor 594</u> (Molecular Probes) 2µl + 664µl sol. Bloq 30 min RT. | | | | | | | | | | | |
| OVEJAS | | | FIV | | | | PA | | | | |
| | Muestra | n | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) | n | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
| | 2 células | 5 | 5 | 5 | 5 | 100% | 4 | 4 | 4 | 4 | 100% |
| | 4 células | 4 | 4 | 4 | 4 | 100% | 5 | 4 | 4 | 4 | 100% |
| | 8 células | 6 | 6 | 6 | 6 | 100% | 18 | 18 | 8* | 8* | 100%* |
| | 16 células | | | | | | 5 | 5 | 5 | 4 | 80% |
| | Mórulas | 36 | 22 | 18 | 18 | 50% | 75 | 45 | 30 | 30 | 40% |
| Blastocistos | 16 | 16 | 16 | 16 | 100% | 3 | 3 | 3 | 3 | 100% | |

| CABRAS | | | FIV | | | | PA | | | | |
|--------|--------------|----|------------|------------|---------|--------------|----|------------|------------|---------|--------------|
| | Muestra | n | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) | n | Analizados | Valorables | n NANOG | Eficacia (%) |
| | 2 células | 6 | 6 | 6 | 6 | 100% | 3 | 2 | 2 | 2 | 66,7% |
| | 4 células | 7 | 7 | 7 | 7 | 100% | 4 | 3 | 3 | 3 | 75% |
| | 8 células | 22 | 22 | 22 | 22 | 100% | 3 | 3 | 3 | 3 | 100% |
| | Mórulas | 16 | 0 | 0 | 0 | 0% | 8 | 3 | 3 | 3 | 37,5% |
| | Blastocistos | 16 | 7 | 7 | 7 | 43,75% | 24 | 24 | 24 | 19 | 79% |

Detalle del protocolo final de inmunodetección de Nanog para embriones de 2 células , 4 células, 8 células, mórulas y blastocistos de ovino y caprino. Obtenidos mediante AP y FIV. Utilizamos como anticuerpo primario *rabbit anti- human Nanog* (Peprotech, ref: 500-P236) y como anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo).

5.3. Comparación entre embriones partenogénéticos y fecundados in vitro de la inmunodetección de la proteína Nanog.

5.3.1. EMBRIONES DE 2 A 8 CÉLULAS:

Ovino:

Con el protocolo óptimo realizamos tinciones en embriones de 2 a 8 células para poder comprender la expresión de la proteína Nanog y saber si hay presencia de células pluripotentes durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario preimplantacional producidos *in vitro* mediante AP y FIV.

En cuanto a la expresión del marcador de pluripotencia Nanog, se puede observar como la proteína Nanog se expresa en los blastómeros de los embriones de 2, 4 y 8 células de ovino y caprino, contrariamente a lo esperado. .

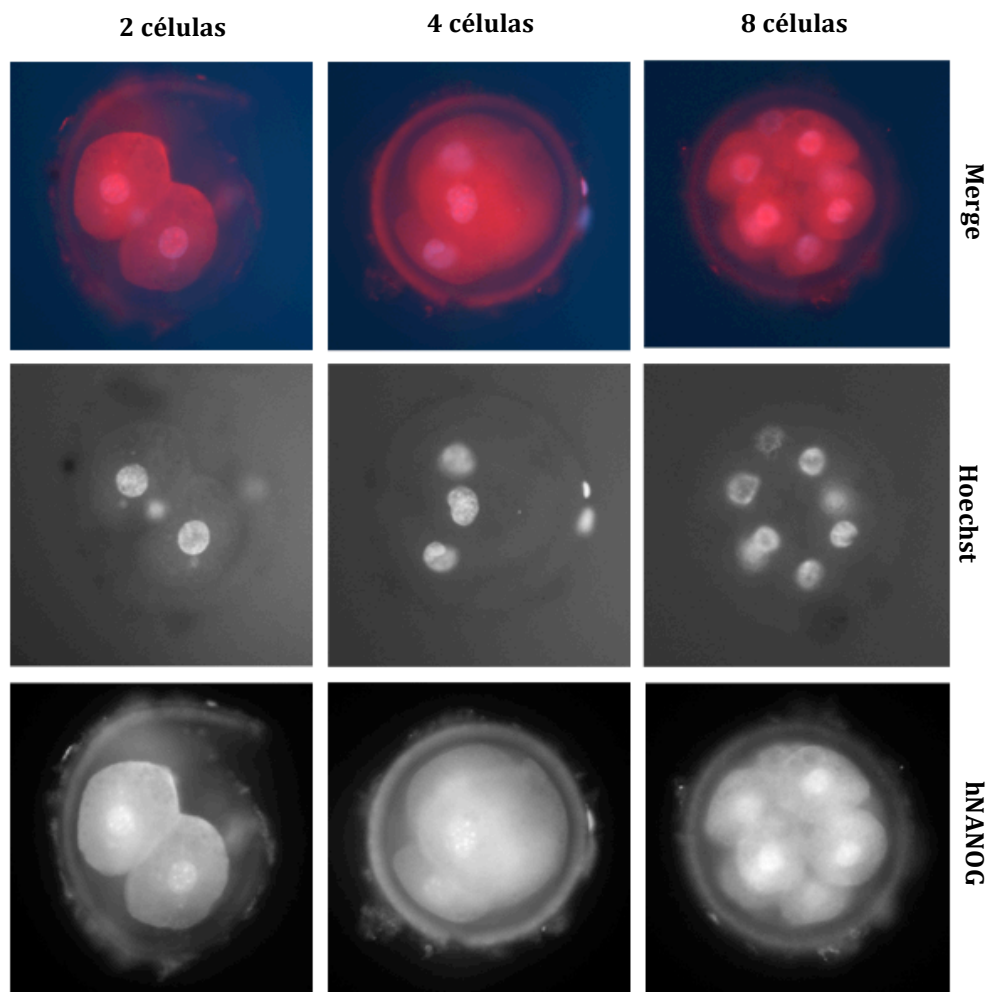


Fig.12 | Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones partenogénéticos de ovino. Puede observarse una señal de la proteína Nanog en el citoplasma y núcleo de todos los blastómeros.

En los embriones de AP en ovino (Fig. 12) observamos que la señal en el núcleo es más intensa que en los embriones de FIV (Fig. 14). Además, en los embriones de 2 células de FIV la señal de la proteína Nanog es inexistente en el núcleo aunque se observa en el citoplasma. Después de este estadio, en embriones de 4 y 8 células ya se aprecia la señal nuclear. También se puede observar en FIV y AP una señal citoplasmática de la proteína Nanog en los blastomeros. Aunque la señal se percibe con mayor definición en los embriones partenogenéticos.

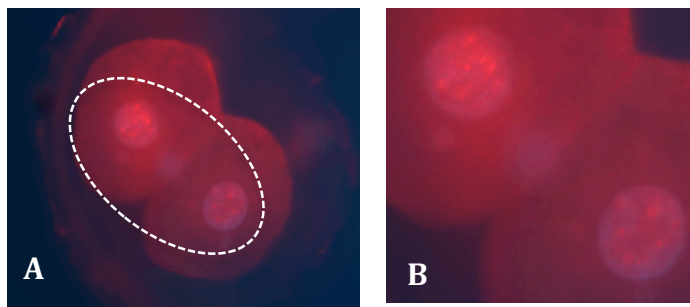


Fig. 13 | Señal de la proteína Nanog en nucléolos. (A) Embrión de 2 células con señal Nanog, el círculo indica los núcleos de las células. **(B)** Ampliación del núcleo del embrión de 2 células de la imagen (A).

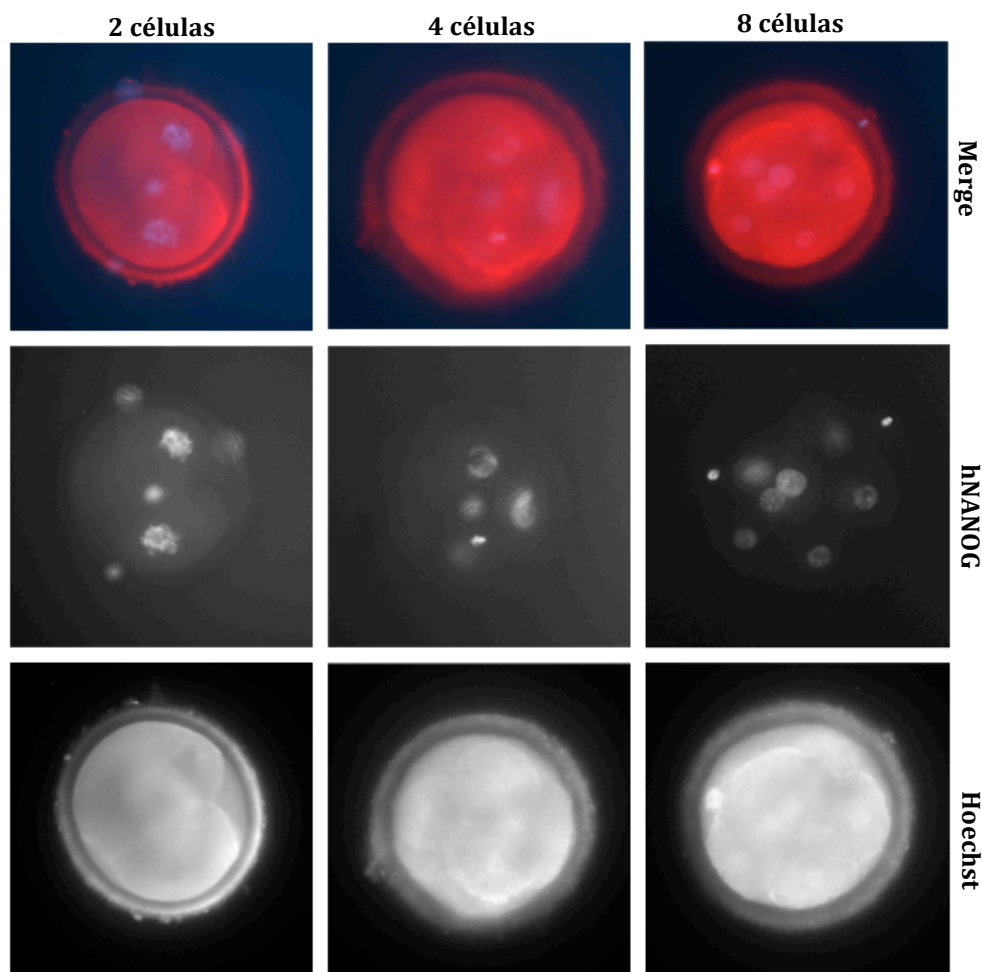


Fig. 14 | Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones FIV de ovino. Se Puede observar una señal en el citoplasma y en el núcleo débil.

Caprino:

Se realiza una pequeña variación en el protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog en embriones caprinos. Disminuimos la concentración del anticuerpo primario *rabbit anti-human Nanog* a una dilución [1:600], pero continuamos con el mismo tiempo de exposición (ON) y temperatura (4°C).

Comparamos la expresión de la proteína Nanog de embriones de 2, 4 y 8 células obtenidos mediante FIV y AP en un laboratorio *in vitro*.

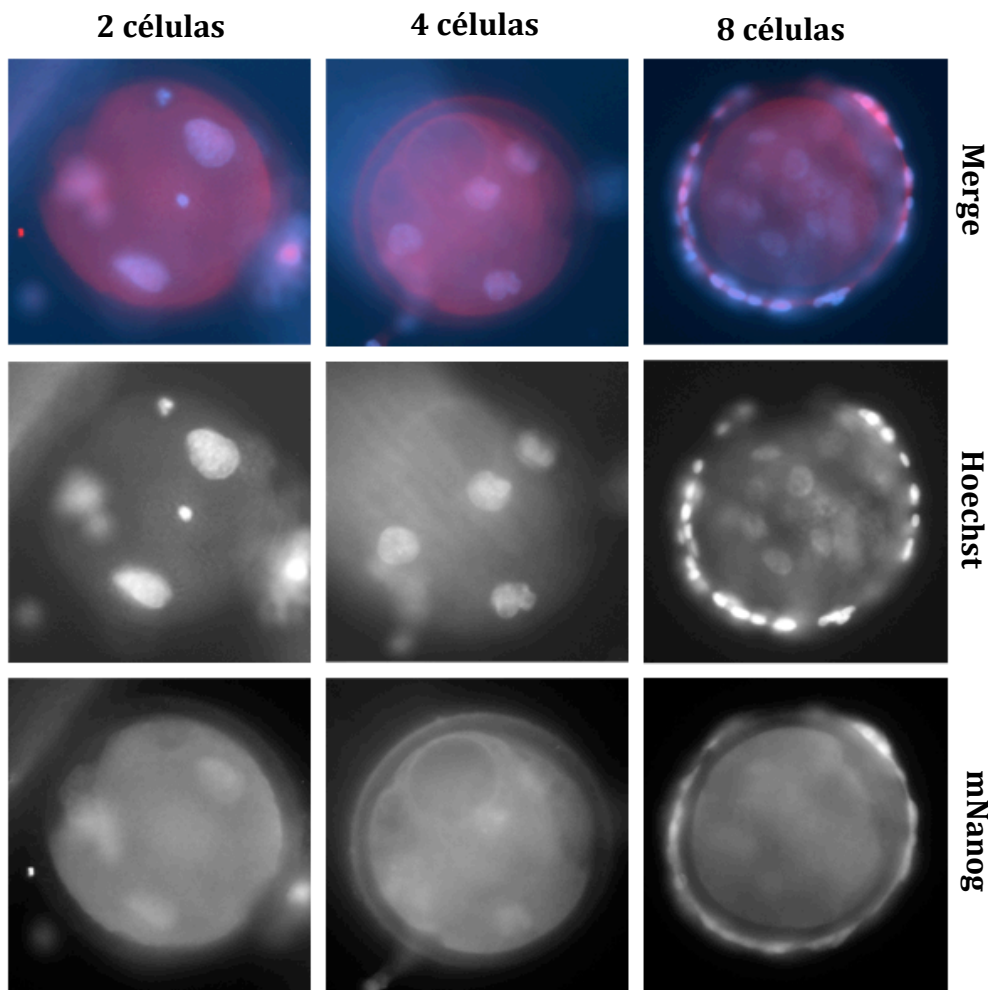


Fig. 15 | Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones partenogenéticos de caprino. Se observa una señal citoplasmática y nuclear en todos los embriones de los diferentes estadios (2, 4 y 8 células)

Como ocurre en la inmunodetección con embriones de ovino, observamos una señal citoplasmática en todos los blastómeros de los embriones de 2, 4 y 8 células de AP (Fig. 15) y FIV (Fig.16). En caprino, la señal se observa en todos los núcleos de las células embrionarias tanto en embriones de FIV como de AP.

En AP, se puede observar señal de la proteína Nanog en el núcleo de los embriones partenogenéticos. Pero en los embriones de 8 células no hay expresión en todos los núcleos de los blastómeros, sólo se puede observar señal en cuatro de los ocho núcleos del embrión. En cambio, en los embriones obtenidos mediante la FIV se observa señal nuclear en los tres estadios y en todos los núcleos de los blastómeros (Fig. 16).

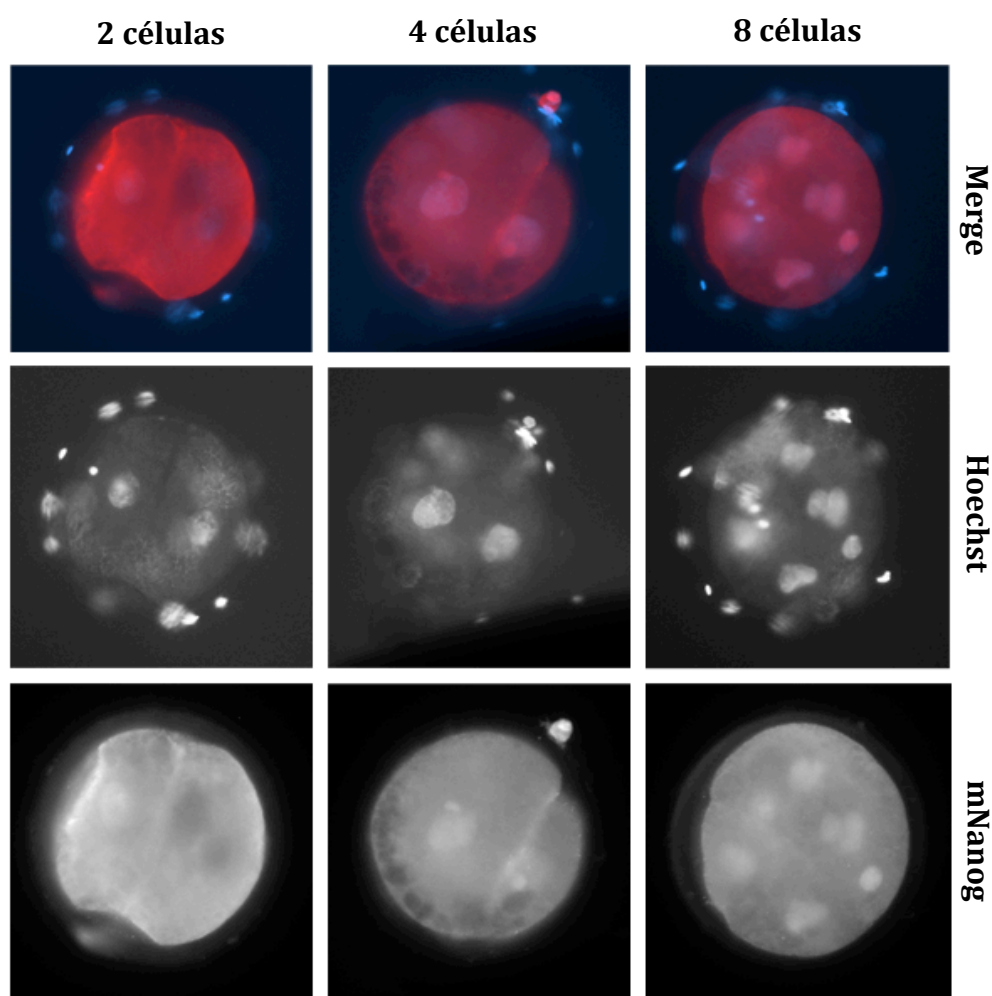


Fig. 16 | Inmunodetección de la proteína Nanog en embriones FIV de caprino. Se observa una señal citoplasmática y señal nuclear en todos los estadios y en todos los núcleos de los blastómeros de cada embrión.

5.3.2. MÓRULAS:

Ovino:

Realizamos la inmunodetección con el mismo protocolo anterior con el fin de analizar los embriones de ovino y caprino en el estadio de mórula.



Fig. 17 | Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas AP de ovino. Se observa expresión de la proteína NANOG. Existe señal nuclear en alguna de las células, y citoplasmática en todas las células.

En cuanto a la expresión del marcador de pluripotencia Nanog se puede observar cómo la proteína Nanog se expresa con señal nuclear en alguna de las células de las mórulas AP de ovino (Fig. 17). En cambio, en mórulas de FIV si que vemos expresión en todas las células con una señal nuclear (Fig. 18). Seguimos observando el marcaje citoplasmático como en embriones iniciales de las dos especies y con los dos métodos de obtención.

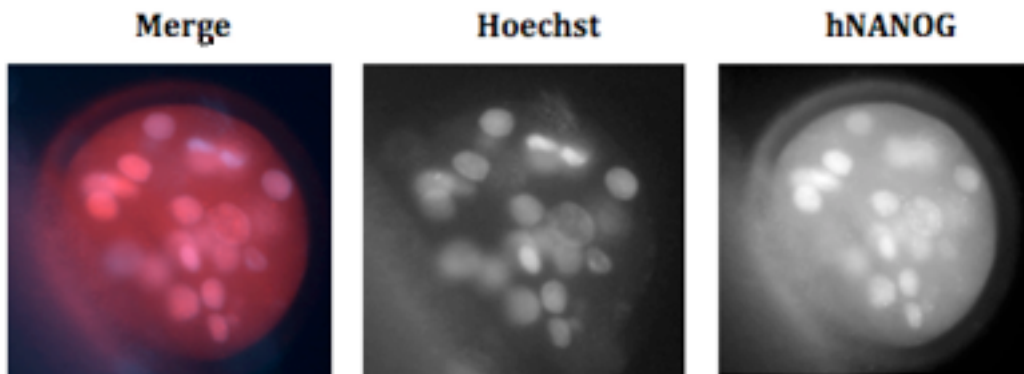


Fig. 18 | Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas FIV de ovino. Se observa señal nuclear en todas las células y una expresión citoplasmática difusa.

Caprino:

En la especie caprina, observamos como las mórulas de AP expresan la proteína Nanog tanto en citoplasma como en núcleo (Fig. 19). Realizamos el mismo protocolo en mórulas FIV pero no se obtuvieron buenos resultados en las tinciones de *Hoechst* ni en la inmunodetección de la proteína Nanog (Fig. 20).



Fig. 19 | Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas AP de caprino. Se observa señal nuclear y citoplasmático en todos los blastómeros.



Fig. 20 | Inmunodetección de la proteína Nanog en mórulas FIV de caprino. Se observa una tinción Hoechst errónea, ya que no vemos todos los núcleos de los blastómeros, y una señal de la proteína Nanog difusa.

5.3.3. BLASTOCISTOS:

Ovino:

Realizamos la inmunodetección con el mismo protocolo anterior en embriones de 2 a 8 células y mórulas de caprino. Además, en el estadio de blastocisto la expresión de la proteína Nanog en embriones de ovino tanto en AP (Fig. 21) como en FIV (Fig. 22) se observa un marcaje nuclear en algunas células del embrión. Sin embargo, se observan señales con mayor intensidad en alguna de las células. En

blastocistos de FIV estas células con mayor intensidad de señal están más localizadas en el centro del embrión.

La proteína tiene una localización nuclear, pero en algunas células la proteína Nanog se localiza tanto en el nucleoplasma como en nucléolos (Fig. 23), dando una fuerte señal en la inmunodetección.

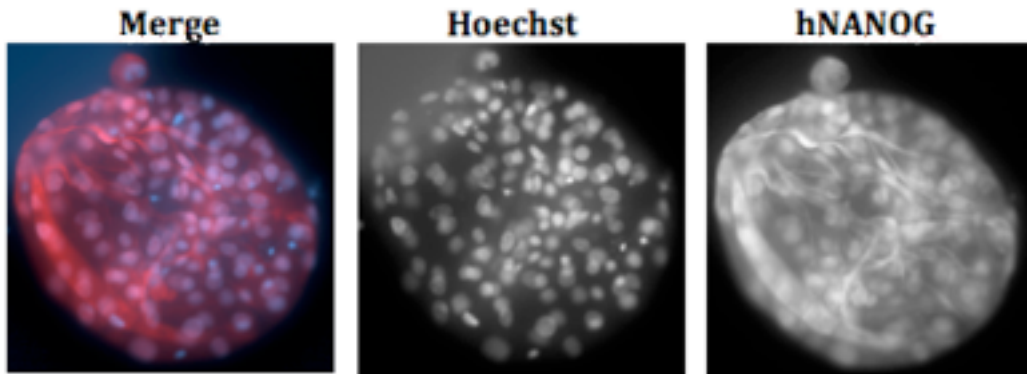


Fig. 21 | Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocistos AP de ovino. Se observa expresión nuclear de las células de MCI y del TE. En algunas células se localiza en nucleoplasma y nucléolo.

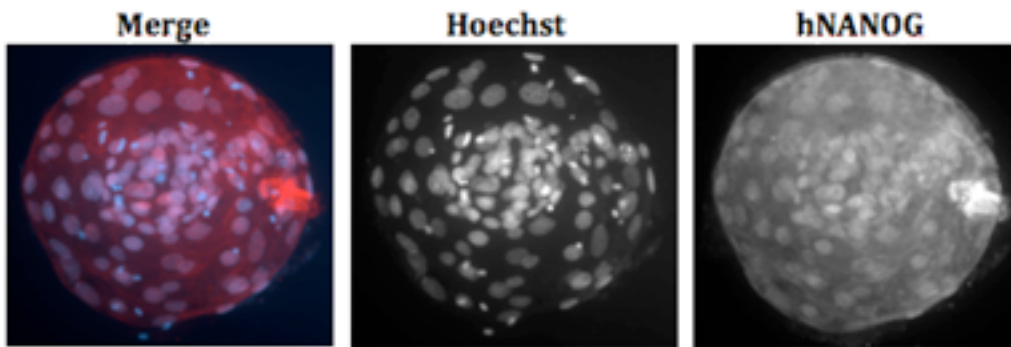


Fig. 22 | Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocisto FIV de ovino. Se observa expresión en los núcleos de las células de MCI y TE. Hay señal en el nucleoplasma y nucléolo de alguna de las células.

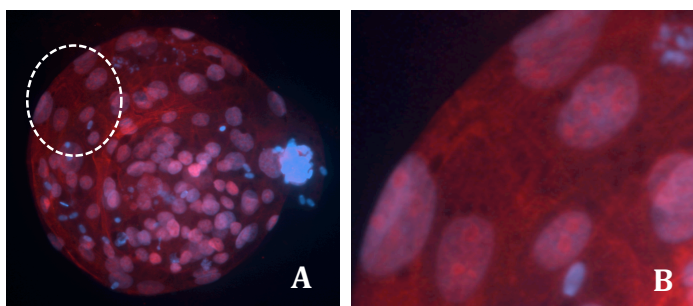


Fig. 23 | Señal de la proteína Nanog en nucléolos. (A) Blastocisto FIV de ovino con señal en núcleo. (B) Ampliación del círculo de (A) donde se distingue la expresión de la proteína Nanog en nucléolo.

Caprino:

Los resultados son los mismos a los observados en los blastocistos de ovino. La expresión de la proteína Nanog es nuclear tanto en los blastocistos partenogénéticos (Fig. 24) como los obtenidos mediante FIV (Fig. 25). Del mismo modo que en ovino se observa una señal de mayor intensidad en algunos de los núcleos celulares del embrión. Esta localización se aprecia mejor en los blastocistos de FIV (Fig. 25). En algunas células se observa una localización de la señal en el nucleoplasma y en el nucléolo (Fig. 26).



Fig. 24 | Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocistos AP de caprino. Se observa señal nuclear de la proteína NANOG en todas las células de la MCI y TE. En algunas células también vemos una localización en el nucleoplasma y nucleolo.

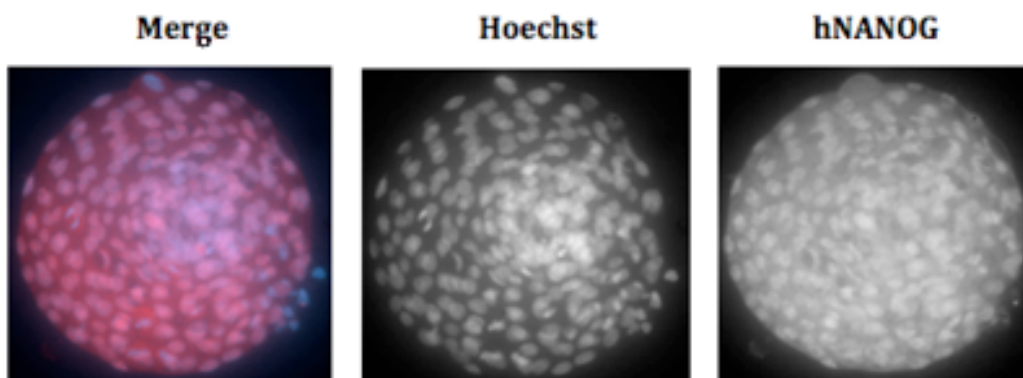


Fig. 25 | Inmunodetección de la proteína Nanog en blastocisto FIV de caprino. Se observa una expresión nuclear de la proteína NANOG en todas las células de la MCI y TE. Hay localización de la señal en nucleoplasma y nucléolo de algunas células.

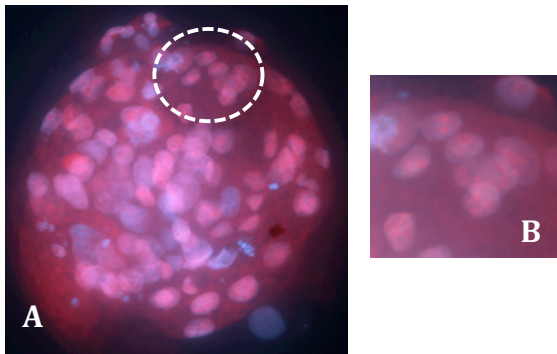


Fig. 26 | Señal de la proteína Nanog en el núcleo. (A) Blastocisto caprino de AP donde observamos expresión nuclear de la proteína Nanog. **(B)** Ampliación del círculo de la imagen (A) donde se distingue expresión en el nucléolo.

5.2.2. Cdx2.

La proteína Cdx2 es una proteína específica de las células multipotentes del TE y su utilidad es comprobar la calidad de los blastocistos según el ratio que presente de células de la MCI en relación a las células del TE.

Inicialmente, pudimos estudiar la expresión de la proteína Cdx2 en blastocisto joven y expandido partenogénéticos de cabras. Puede verse en cualquiera de las dos fases, que la expresión de Cdx2 está restringida a las células del TE. Mientras que en la MCI, identificada por un grupo de células agregadas, no ha sido detectado su señal.

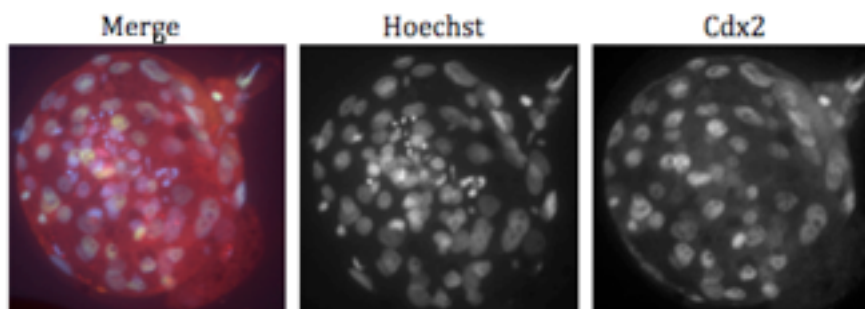


Fig. 27 | Inmunodetección con Cdx2 en blastocistos joven de FIV de cabra. Utilizamos como anticuerpo primario *mouse anti-cdx2* (BioGenex) y *Alexa Fluor 488* (verde) como anticuerpo secundario.

Hemos analizado esta inmunodetección morfológica en dos fases diferentes del estadio de blastocisto: joven y expandido. La expresión de Cdx2 en el blastocisto joven (n=1) se puede observar en un 68'97% de los núcleos de las células (60/87), esto sugiere que se expresa en todas las células del TE (Fig. 27).

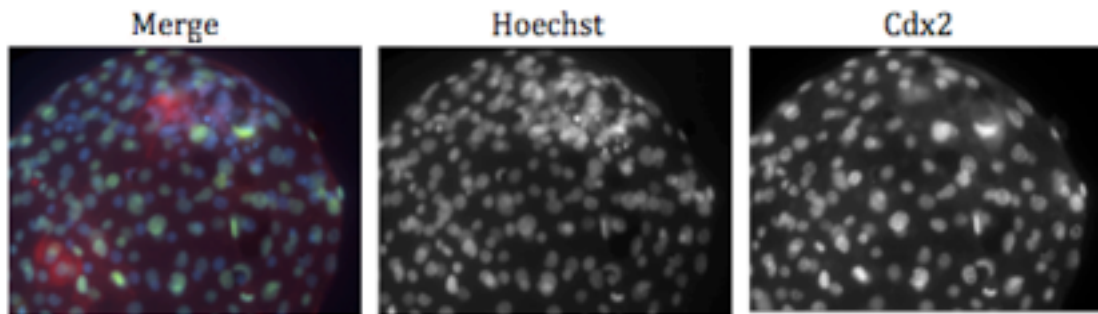


Fig. 28 | Inmunodetección de Cdx2 en blastocisto expandido partenogenético de cabra. Utilizamos como anticuerpo primario *mouse anti-Cdx2* (BioGenex) y *Alexa Fluor 488* (verde) como anticuerpo secundario.

En cambio, en el blastocisto expandido la proporción de células con señal Cdx2 es menor que en el blastocisto inicial, 137/257 (53,30%) (Fig.28). Estos hallazgos solo hemos podido observarlos en dos blastocistos, así que es necesario un análisis más detallado y con más muestra.

5.4. Comparación entre blastocistos AP y FIV de la inmunodetección de la proteína Nanog.

Con el objetivo de comparar la expresión de la proteína Nanog entre los blastocistos obtenidos por AP y FIV en ovino y caprino, realizamos un conteo de todas las células de los blastocistos mediante tinción Hoestch y comprobamos la relación con el número de células con marcaje Nanog. Así observamos que el porcentaje de células con expresión Nanog es de más del 60% en los grupos de FIV en embriones de ovino y AP en caprino, y más del 80% en blastocistos AP de ovino y FIV de caprino. No se observan diferencias entre especies ni entre sistemas de producción de embriones.

Tabla 4 | Recuento celular total y expresión de Nanog en blastocistos in vitro de pequeños rumiantes.

| Especie | Tratamiento | N | Nº células (media±d.e) | | |
|---------|-------------|----|------------------------|-------------|--------------------------|
| | | | Total | NANOG | Porcentaje (Nanog/total) |
| OVEJA | FIV | 10 | 115'6±58'9 | 77'1±39'6 | 66'7% |
| | AP | 3 | 134±83'2 | 120±79'8 | 89'6% |
| CABRA | FIV | 6 | 167'7±148'2 | 140'2±115'6 | 83'6% |
| | AP | 12 | 72'2±22'5 | 43'7±27'5 | 60'5% |

Comparación entre blastocistos de ovino y caprino obtenidos mediante FIV y AP usando el protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog. Numero de embriones analizados. Numero de células totales y numero de células con expresión de Nanog Expresado como la media± desviación estándar.

Capítulo 6:

Discusión.

Este estudio se realizó con embriones de ovino y caprino producidos mediante FIV y AP en el laboratorio de FIV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los resultados obtenidos en la producción de embriones ovinos (Tabla 1) es menor que la que observamos en otros estudios del mismo equipo, como por ejemplo Catalá *et al.* (2012) 13% en ovino. A diferencia de los embriones caprinos donde los resultados (Tabla 1) incluso son mayores que los valores obtenidos anteriormente por el mismo equipo de investigación (21% en Romaguera *et al.* 2010). Los bajos resultados obtenidos en ovino podrían deberse al hecho de que la especie de estudio por excelencia de este laboratorio es la caprina.

En este estudio, nuestra hipótesis es la utilización de marcadores de pluripotencia como la proteína Nanog para el análisis de la calidad de los embriones preimplantacionales producidos por FIV y AP en pequeños rumiantes. Nuestro objetivo es determinar si la expresión de la proteína Nanog es un buen parámetro para poder evaluar la pluripotencia de las células embrionarias y la calidad de los blastocistos en cabras y ovejas prepúberes.

En la optimización del protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog, inicialmente utilizamos el anticuerpo *rabbit polyclonal Anti- Mouse Nanog* como el utilizado en embriones de ratón. A pesar de que este anticuerpo fue utilizado antes para la inmunodetección de la proteína Nanog en células madre pluripotentes inducidas de caprino (Guo *et al.* 2014), estos autores no obtuvieron buenos resultados en embriones caprinos. Por tanto, conociendo los resultados de He *et al.* (2006) en embriones caprinos con el anticuerpo *rabbit Anti-Human Nanog*, optimizamos el protocolo de inmunodetección de la proteína Nanog en embriones ovinos y caprinos con el mismo anticuerpo.

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre el desarrollo embrionario temprano proviene de estudios en embriones de ratón y células madre embrionarias. En este estudio analizamos la localización de la proteína Nanog mediante inmunocitoquímica en embriones preimplantacionales producidos *in vitro* de ovino y caprino. En caprino se han realizado algunos estudios sobre la

localización de la proteína Nanog. Sin embargo, en ovino no hemos encontrado ninguno.

En ratón y humanos la expresión de la proteína Nanog está limitada en las células MCI y no son observadas en la TE de los blastocistos. Esto indicaría que el Nanog podría ser un buen marcador de la pluripotencia.

En embriones de rumiantes, las células embrionarias son totipotentes hasta el estadio de 8-16 células, a partir de aquí en el estadio de mórula, algunas células empiezan a perder la totipotencia y a volverse pluripotentes, y ya en el estadio de blastocisto se distinguen dos líneas celulares bien diferenciadas: las células MCI de características pluripotentes y las células del TE que son multipotentes.

En este estudio vamos a analizar la localización de la proteína Nanog en embriones en tres estadios de desarrollo: embriones de 2 a 8 células, mórulas y blastocistos.

Nuestros resultados demuestran que la proteína Nanog se observa en embriones de 2 a 8 células contrariamente a lo esperado. Estos resultados son similares a los observados por Xiao-li *et al.* (2015) en caprino, los cuales describieron que en embriones de 2, 4 y 8 células también se observaba una débil señal de la proteína Nanog. También existía un patrón de expresión de ARNm Nanog donde aumentaba gradualmente desde el estadio de 2 células hasta blastocisto *in vivo* (fecundados *in vitro*) (Xiao-li *et al.* 2015). En otro estudio realizado en embriones de caprino (He *et al.* 2006) señalan que en embriones de 2 y 4 células Nanog no fue generalmente detectado aunque algunas células aparecían positivas. Estos autores indicaban que esta señal podría ser una falsa señal. En cambio, en embriones de 8 a 16 células sí que detectaron ARNm Nanog (He *et al.* 2006). En bovino Khan *et al.* 2012 no observaron ninguna señal de la proteína Nanog en embriones hasta el estadio de 8 células. Lo que coincide con los resultados observados por Madeja *et al.* 2013, ya que obtuvieron un aumento del ARNm Nanog después de la activación del genoma embrionario que en bóvidos es entre los estadios de 8 a 16 células.

Existen diferencias en la localización de la expresión de la proteína Nanog en el citoplasma y el núcleo de las células embrionarias de ovino y caprino. La localización citoplasmática implica la síntesis y acumulación de proteínas (Madeja

et al. 2013). Según nuestras observaciones, la expresión de la proteína Nanog en el núcleo varía entre estadios y métodos de obtención *in vitro* en los embriones de pequeños rumiantes. Nuestros resultados indican una señal nuclear en todos los embriones caprinos. En ovino la expresión en embriones FIV es casi imperceptible, pero en AP existe una señal intensa incluso con marcaje en los nucléolos.

Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por He *et al.* 2006 en embriones caprinos de 8-16 células, donde también existe expresión de la proteína Nanog en el núcleo de las células de embriones *in vivo*, como ocurre en embriones de ratón (Hatano *et al.* 2005). En el estudio de Xiao-li *et al.* (2015) observaron señal en el núcleo de embriones de cabra adulta de 8 células tanto *in vivo* (fecundados *in vitro*) como *in vitro* (AP), pero no en embriones de 2 y 4 células. En los embriones bovinos no hay señal nuclear específica de la proteína Nanog entre el oocito y el estadio de 8-16 células (Khan *et al.* 2012).

En nuestro estudio observamos como en el estadio de mórula existe expresión de la proteína Nanog en núcleo y citoplasma tanto en los embriones producidos por FIV como por AP en ovino y caprino. En caprino He *et al.* (2006) analizaron embriones partenogénéticos, *in vitro* e *in vivo* y tampoco encontraron diferencias en la localización de la proteína Nanog en las células. En un estudio reciente con embriones de cabra (Xiao-li *et al.* 2015) obtuvieron señal en núcleo y citoplasma en mórulas *in vivo* (fecundadas *in vitro*) e *in vitro* (AP). En rumiantes se detectó una expresión nuclear de todas las células en el estadio de mórula temprana (Khan *et al.* 2012). En cambio, las mórulas *in vivo* de porcino que no expresaron señal alguna de la proteína Nanog (Kuijk *et al.* 2008). En estudios más recientes de embriones de bovino, en el estadio de mórula se localizó la proteína Nanog formando un anillo característico alrededor del núcleo de algunas células (Madeja *et al.* 2013). Esto les sugirió que la proteína Nanog aparece *de novo* en el estadio de mórula como producto de la activación del genoma embrionario. En algunas de nuestras mórulas en ovino y caprino se puede ver una señal más concreta en el núcleo, una localización específica de la proteína Nanog en los nucléolos de más intensidad que en el nucleoplasma. Esto también se observó en las mórulas *in vivo* de cabra en He *et al.* 2006, esto indica que el secuestro nucleolar y la disminución de Nanog se está produciendo en estas células, así como en el TE. Puede ser que

sólo unas pocas células en el embrión de rumiantes permanecen realmente pluripotentes, tal y como se define por la expresión de Nanog (He *et al.* 2006).

En nuestros resultados observamos como en el estadio de blastocisto la proteína Nanog se expresa en el citoplasma y núcleo tanto de las células de la MCI como del TE en embriones ovinos y caprinos. A diferencia de lo que resultó en los blastocistos de ratón, donde la expresión de Nanog se limita a las células que pertenecen a la MCI (Hatano *et al.* 2005). Otros estudios realizados en caprino observaron expresión de la proteína Nanog en el núcleo y citoplasma de los blastómeros de embriones *in vivo* (fecundados *in vitro*) e *in vitro* (AP) (Xiao-li *et al.* 2015). En He *et al.* (2006) fue descrito en la fase de blastocisto joven una señal intensa en la superficie de los nucléolos y otra más atenuada en el nucleoplasma de las células del TE. Además, en la fase de blastocisto expandido la expresión era nuclear en la MCI (nucleoplasma y nucléolo) y TE (núcleolo) (He *et al.* 2006). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, ya que en algunas células se observa localización de la señal de la proteína Nanog en nucleoplasma y nucléolo de todos los blastocistos. En porcino (Kuijk *et al.* 2008) no se detectó la proteína Nanog en blastocistos *in vivo* e *in vitro*, esto coincide con los resultados obtenidos en QPCR (Quantitative RT-PCR) donde no detectaron niveles suficiente de ARNm Nanog. Estas observaciones sugieren que Nanog no tiene un papel importante en etapas de segregación de linajes tempranos o en la definición de la población de células pluripotentes de embriones porcinos (Kuijk *et al.* 2008).

En este mismo estudio los blastocistos *in vitro* de bovino presentaron expresión de Nanog en algunas células de la MCI y otras eran negativas, y ninguna señal en el TE (Kuijk *et al.* 2008), como ocurre en los embriones de ratón. Esto les sugirió que las células con señal de Nanog serían el futuro epiblasto. Contrariamente Khan *et al.* (2012) en bovino observaron una expresión de la proteína Nanog en todas las células del MCI y también en todas las células del TE. La localización de la proteína Nanog en el MCI se da en el nucleoplasma de los blastómeros. Para obtener una mayor comprensión del porqué de esta localización nuclear, realizaron un análisis de *Western Blot* que reveló que los oocitos y embriones hasta el estadio de mórula mostraban una banda de 28kD mientras que los embriones de día 7 a día 9 contenían ambas las bandas de 28kD y 50kD. La especificidad de la banda 28kD

fue confirmada por pre-adsorción de la solución de anticuerpo con la proteína Nanog recombinante (Khan *et al.* 2012). De acuerdo con la literatura (Wang *et al.* 2008) Nanog forma homodímeros con el fin de ejercer su función pluripotente, esto les sugirió que la forma homodímera de 50kD corresponde a la forma nucleoplásmica en las células de la MCI, que estas son las células pluripotentes. El polipeptido de 28kD corresponde a la forma nucleolar la cual sólo es reconocida cuando la inmunofluorescencia está concentrada en el nucléolo (Khan *et al.* 2012). Además se ha considerado que la proteína nucleolar no estaría involucrada en la pluripotencia (Pant *et al.* 2009). Por otra parte, se ha propuesto que el secuestro de la proteína Nanog en los nucléolos esta involucrado en el proceso de inactivación que al final conduce a la ubiquitinación y la degradación del factor de transcripción (Tsai *et al.* 2002).

Otro estudio más reciente con embriones bovinos Madeja *et al.* 2013 describieron la localización de la proteína Nanog en el núcleo de las células MCI y añaden que en las células TE la señal de la proteína Nanog se encuentra en el citoplasma y ausente en el núcleo de blastocistos de día 7, esto coincide con la cavitación y separación espacial de los dos linajes (MCI y TE) (Madeja *et al.* 2013). Esto puede ser la primera indicación de cómo las diferencias funcionales se correlacionan con la posición de las células. Con el fin de ser activos el factor de transcripción Nanog necesita entrar en el núcleo, por lo tanto, en este estadio la proteína Nanog puede estar sometida a transporte activo (Madeja *et al.* 2013). En blastocistos de día 8 Oct4 y Nanog están co-localizados, esto concuerda con estudios que indican la estimulación mutua entre estos factores (Madeja *et al.* 2013). La conclusión que obtuvieron es que Nanog se detecto inicialmente en el citoplasma de ciertas células de las mórulas y después en blastocisto de día 8 se convirtió en MCI específico (Madeja *et al.* 2013).

A partir de estos experimentos, se puede concluir que los mamíferos difieren en la segregación de los linajes tempranos, lo que potencialmente influye en la formación y características de la población de células pluripotentes.

Para verificar los resultados observados en la inmunodetección de la proteína Nanog, realizamos un recuento celular de la expresión proteica en blastocistos *in*

vitro. Como podemos ver en la Tabla 3 no encontramos diferencias en cuanto al número de células con expresión de la proteína Nanog o células totales entre los embriones de AP y FIV de ovino y caprino. En otros estudios, Gómez *et al.* (2009) encontraron diferencias entre embriones de AP y FIV en bovino. El recuento de las células TE es significativamente menor y en consecuencia el número de células totales también lo es. Por otra parte, estos blastocistos no mostraron diferencias en el número de células de la MCI en relación con el número total de células. Estas diferencias entre nuestros resultados y Gómez *et al.* pueden deberse al tamaño de muestra utilizado en su estudio ya que es mayor que el nuestro.

Nuestros resultados de %MCI/células totales son de más de 60% y 80% en oveja y cabra indistintamente. A diferencia de lo que observamos en otros estudios (con tinción diferencial) donde los porcentajes son de 29'9% en cabra (Hammami *et al.* 2014), 27% en FIV y 31'2% en AP en blastocistos de oveja (Catalá *et al.* 2012), 21% en porcino (de la Fuente *et al.* 1997), 22'6% en bovino y 27'8% en ratón (Thouas *et al.* 2001). Contribuyendo a los resultados obtenidos de %MCI/células totales, estudiamos los resultados de la inmunodetección de Cdx2 donde se observa un 69% aproximadamente de células del TE en blastocisto joven y 53% en blastocisto expandido. Si tenemos en cuenta estos resultados observamos que nuestros porcentajes totales (%MCI y %TE) son mayores, y esto sugiere que la inmunodetección de la proteína Nanog no es específica porque no solo se expresa en las células pluripotentes de la MCI, si no que también nos tiñe células que pertenecen al TE.

En conclusión, podemos afirmar con nuestros resultados que contrariamente a nuestra hipótesis no podemos utilizar la inmunodetección de la proteína Nanog como marcador de las células pluripotentes existentes en la MCI de los blastocistos de pequeños rumiantes.

Capítulo 7:

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

1. Se ha puesto a punto el protocolo para la detección de la proteína Nanog en ovino y caprino y en embriones producidos mediante FIV y partenogénéticos. En todos los embriones de ovino ha funcionado el mismo protocolo y en los embriones caprinos se ha tenido que disminuir la concentración del anticuerpo primario.
2. La proteína Nanog se ha expresado en todo el desarrollo embrionario preimplantacional, lo que nos indica que no es un buen marcador de la pluripotencia de las células embrionarias.
3. No hemos encontrado diferencias en el número de células con expresión Nanog entre los embriones de ovino y caprino producidos mediante FIV y partenogénesis.

Capítulo 8:

Bibliografía.

Armstrong DT. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 55: 1303-1322.

Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. 57: 275-284.

Beck F, Erler T, Russell A, James R. (1995). Expression of *cdx-2* in the mouse embryo and placenta: Possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Development Dynamics*. 204(3): 219-227.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27(1): 147-58.

Brackett BG, Oliphant G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Repr.* 12: 260-274.

Bredbacka P. (1995). Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. *Theriogenology*. 44: 159-166.

Catalá MG, Izquierdo D, Rodríguez-Prado M, Hammami S, Paramio MT. (2012). Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertil Steril.* 4:1004-8.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. (2003). Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113:643-655.

Chambers I, Smith A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 23: 7150-7160.

Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V.E., Kontgen, F., and Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumors in *Cdx2* mutant mice. *Nature*. 386: 84-87.

Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T and Rossant J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell.* 10: 615–624.

Cheng WTK, Moor RM, Polge CE. (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology.* 25: 146.

Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis AK, Reinholdt LG. (2014). Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc.* 9(3): 559-74.

de la Fuente R, King WA. (1997). Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote.* 5: 309–320.

Donnay I, Partridge R, Leese H. (1999). Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? *Reprod. Nutr. Dev.* 39: 523-533.

Gómez E, Gutiérrez-Adán A, Díez C, Bermejo-Alvarez P, Muñoz M, Rodríguez A, Otero J. (2009). Biological Differences between in Vitro Produced Bovine Embryos and Parthenotes. *Reproduction.* 137: 285–95.

Guo Y, Lei L, Ma X, Wang H. (2014). Characterization of the Proximal Region of the Goat NANOG Promoter That Is Used for Monitoring Cell Reprogramming and Early Embryo Development. *The Veterinary Journal.* 199: 80–87.

Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Carter MG, Ko MS, Dey SK. (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 101(28): 10326–10331.

Hammami S, Izquierdo D, Catalá MG, Paramio MT, Morató R. (2014). In vitro developmental competence of prepubertal goat oocytes cultured with recombinant activin- A. *Animal* 8:94-101.

Hanada A. (1985). In vitro fertilization in goats. *Jpn J Anim Reprod* 31: 21–6.

Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 230: 187–198.

Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev* 122:67-79.

He S, Pant D, Schiffmacher A, Bischoff S, Melican D, Gavin W, Keefer C. (2006). Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: Novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1512–1522.

Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M, Betteridge K, (2010), *Essentials of Domestic Animal Embryology*. China, Elsevier. Chapter 6, pag: 68-77.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T & Callesen H. (1999) High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 683–700.

Johnson MH and McConnell JM. (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 583–597.

Keefer CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. (2007). Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci* 98: 147–168.

Khan DR, Dubé D, Gall L, Peynot N, Ruffini S, Laffont L, Le Bourhis D, Degrelle S, Jouneau A, Duranthon V. (2012). Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. *PLoS ONE*. 7(3): 1–12.

Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H. (2000). Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63: 1698–1705.

Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HTA, Oei CHY, Haagsman HP. (2008) Differences in early lineage segregation between mammals. *Developmental Dynamics* 237: 918–927.

Kumar BM, Jin HF, Kim JG, Ock SA, Hong Y, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. (2007). Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibro-blasts and mesenchymal stem cells. *Dev Dyn* 236: 435–446.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 11:300- 308.

Leoni G, Berlinguer F, Succu S, Bebbere D, Mossa F, Madeddu M, Ledda S, Bogliolo L, Naitana S. (2008). A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 373-382.

Lonergan P, Pedersen HG, Rizos D, Greve T, Thomsen PD, Fair T, Evans A, Boland MP. (2004). Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 71: 1096-1100.

Madeja ZE, Sosnowski J, Hryniewicz K, Warzych E, Pawlak P, Rozwadowska N, Plusa B, Lechniak D. (2013). Changes in Sub-Cellular Localisation of Trophoblast and Inner Cell Mass Specific Transcription Factors during Bovine Preimplantation Development. *BMC Dev Biol.* 13: 1–17.

Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT. (1994). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology.* 41: 969-980.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631–642.

Morton, K. (2008). Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 137-143.

Naturil-Alfonso C, Saenz-de-Juano MD, Peñaranda DS, Vicente JS, Marco-Jiménez F. (2011). Parthenogenic Blastocysts Cultured under in Vivo Conditions Exhibit Proliferation and Differentiation Expression Genes Similar to Those of Normal Embryos. *Animal Reproduction Science*. 127: 222–28.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95: 379–391.

Niwa H, Miyazaki J and Smith AG. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or selfrenewal of ES cells. *Nat. Genet*. 24: 372–376.

Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. *Cell*. 123: 917–29.

Paffoni A, Brevini TAL, Gandolfi F, Ragni G. (2008). Parthenogenetic Activation: Biology and Applications in the ART Laboratory. *Placenta* 29: 121–25.

Palmieri SLPW, Hess H, Schöler HR. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology*, 166, 259–267.

Pant D, Keefer CL. (2009). Expression of Pluripotency-Related Genes during Bovine Inner Cell Mass Explant Culture. *Cloning and Stem Cells* 11: 355–365.

Paramio, MT, and D Izquierdo. (2014). Current Status of in Vitro Embryo Production in Sheep and Goats. *Reproduction in Domestic Animals* 49: 37–48.

Parrish J, Susko Parrish J, Leibfried Rutledge M, Crister E, Eyeston W, First N (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.

Pesce M and Schöler HR. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of

mammalian development. *Stem Cells* 19: 271–278.

Plante L, King W. (1994). Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11: 515- 529.

Purpera MN, Giraldo AM, Ballard CB, Hylan D, Godke RA, and Bondioli KR. (2009). Effects of Culture Medium and Protein Supplementation on mRNA Expression of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Molecular Reproduction & Development* 76: 783–93.

Ralston A and Rossant J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin. Genet.* 68: 106–112

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550–551.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. (2008). Consequences of in Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 44–50.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 234-248.

Romaguera R, Casanovas A, Morató R, Izquierdo D, Catalá M, Jiménez-Macedo A, Mogas T, Paramio M. (2010). Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. *Theriogenology.* 74(3): 364-73.

Rossant J. (2004). Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 573–581.

Schier, A. F. (2007). The maternal–zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316: 406–407.

Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. (2005). Cdx2 Is Required for Correct Cell Fate Specification and Differentiation of Trophectoderm in the Mouse Blastocyst. *Development*. 13(9)2: 2093–2102.

Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, Lim ML, Khodadadi K, Verma PJ. (2011). NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *Anim. Sci* 89: 2708–2716

Takahashi Y, First N (1992). In vitro development of bovine one cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, aminoacids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod. Fertil.*, 30:493-497.

Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. (2001). Simplified Technique for Differential Staining of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells of Mouse and Bovine Blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* 3:25-29.

Tsai RY, McKay RD. (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev.* 16:2991-3003.

van Eijk MJ, van Rooijen MA, Modina S, Scesi L, Folkers G, van Tol HT, Bevers MM, Fisher SR, Lewin HA, Rakacolli D, Galli C, de Vaureix C, Trounson AO, Mummery CL, Gandolfi F. (1999). Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod.* 60: 1093–1103.

Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online.* 7: 664–670.

Van Soom A, Ysebaert M, de Kruif A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 47- 56.

Wang H, Dey SK. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7(3): 185-99.

Wang J, Levasseur DN, Orkin SH. (2008). Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105: 6326–6331.

Wu G, Han D, Gong Y, Sebastiano V, Gentile L, Singhal N, Adachi K, Fishedick G, Ortmeier C, Sinn M, Radstaak M, Tomilin A, Scholer H R. (2013). Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. *Nature Cell Biology,* 15, 1089–1097.

Xiao-li Y, Xiao-e Z, Hua-yan W, Bao-hua M. (2015). Expression patterns of OCT4, NANOG, and SOX2 in goat preimplantation embryos from *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Integrative Agriculture.* 1(7):1398-1406

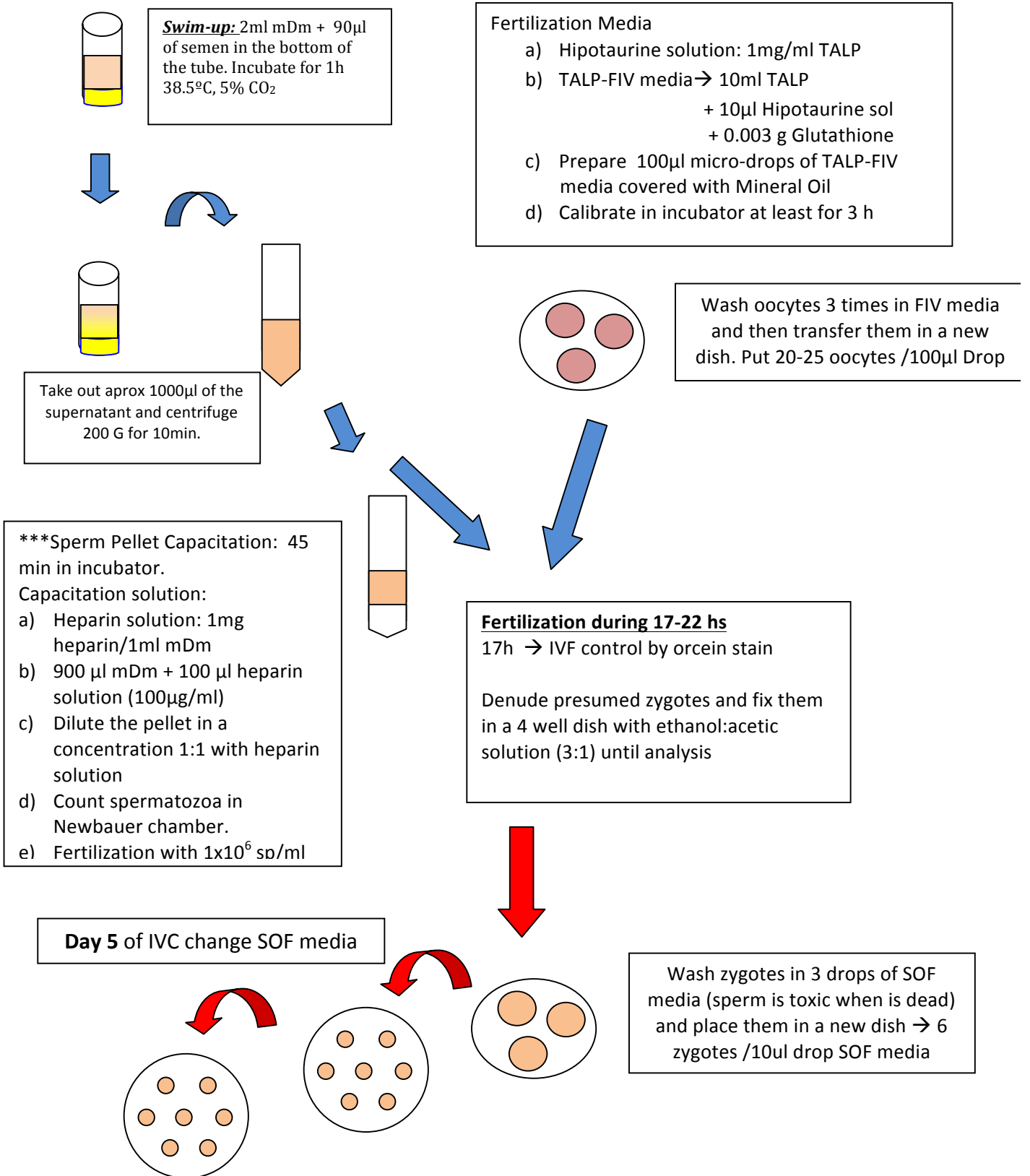
Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG (1991). *In vitro* fertilization of goat oocyte. *Biol. Reprod.* 44: 1177-1182.

Zernicka-Goetz M, Morris SA, Bruce A. 2009. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat Rev Genet.* 10(7): 467-77.

Anexos.

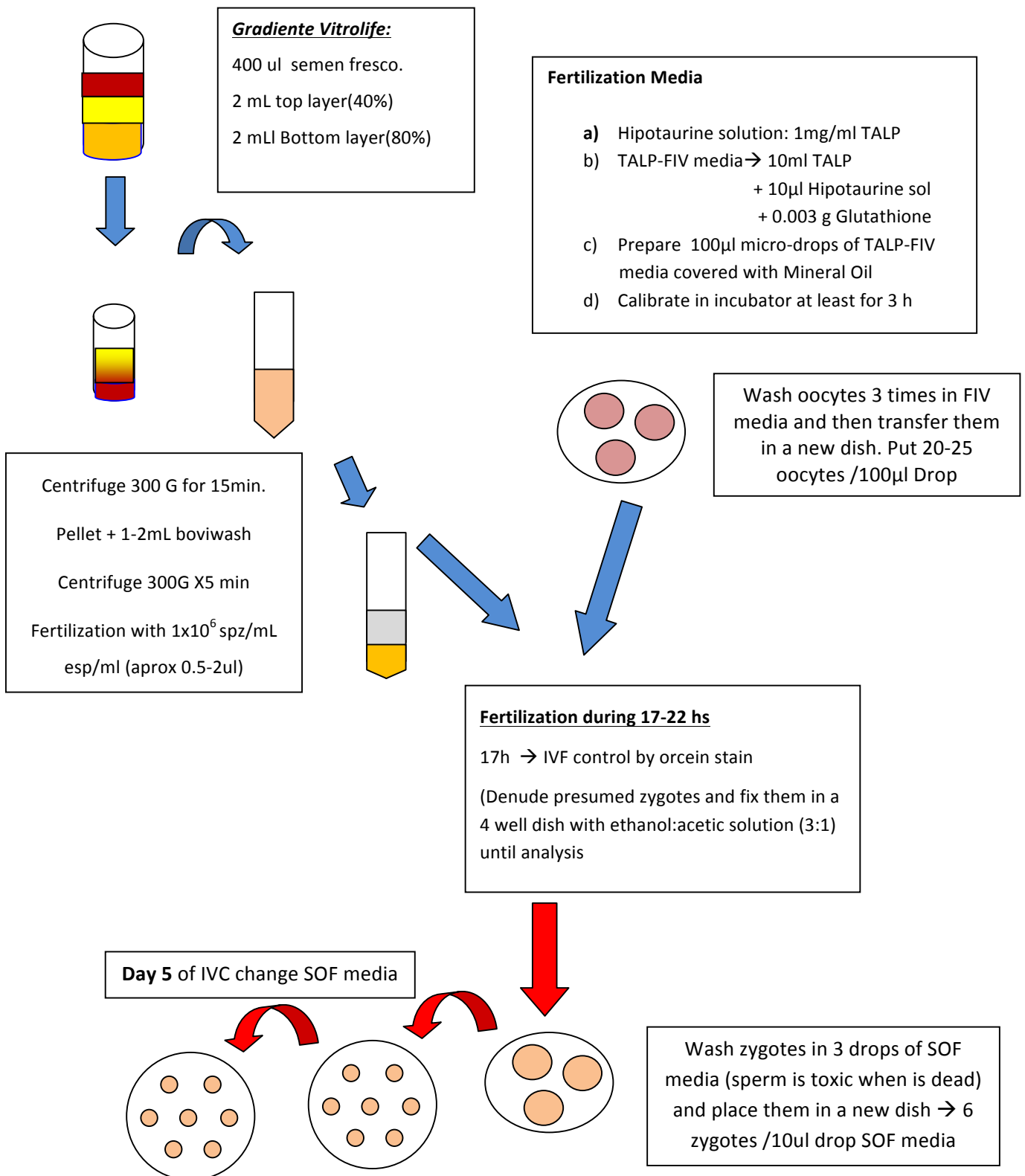
Protocolo de FIV con oocitos de cabra mediante swim-up

(Maria G. Catalá)



Protocolo de FIV con oocitos de cabra mediante gradiente

(Maria G. Catalá)



Protocolos medios de cultivo

- **Medio para Slicing**

| | | |
|--------------------|----------|--------|
| | 500ml | 1lt |
| TCM199 (M2520) | 7.55g | 15.1 g |
| NaHCO ₃ | 1.1g | 2.2 g |
| Gentamicin | 0.025 ml | 0.05ml |

Ajustar osmolaridad a 292-297 mOsm con H₂O miliQ

Filtrar con un filtro de 0.22µm

- **Medio de Maduración in vitro (MIV)**

| | Ref | Stock | Final volume 15ml |
|------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| TCM199 | M-4350 Sigma | | |
| FSH | F-8174 Sigma | 1.5mg/ml (5ug/ml) | 50ul |
| LH | L-5269 Sigma | 1.79mg/ml (5ug/ml) | 41.89 |
| E2 | E-2257 Sigma | 0.1mg/ml (1ug/ml) | 150ul |
| EGF | E-4127 Sigma | 0.002mg/ml(10ng/ml) | 75ul |
| SFB | F-9665 Sigma | 10% | 1.5ml |
| Antibiotic-antimicotic | 15240-062 gibco | 1% | 150µl |
| Cysteamine | M-9768 Sigma | 100µM | 75µl |
| Glutamine | G-8540 | 2mM | 150µl |
| Sodium Piruvate | P-4562 | 10mg/ml (0.2mM) | 33µl |

Fecundación in vitro

- **mDM Stock Media (1 mes)**

| | gr /500ml H ₂ O | Gr /250ml |
|---|----------------------------|-----------|
| NaCl | 3.2750 | 1.6375 |
| KCl | 0.15 | 0.075 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.165 | 0.0825 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 0.0565 | 0.0283 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0.053 | 0.0265 |
| Penicilin | 0.025 | 0.0125 |
| Fenol Red | 0.001 | 0.0005 |

- **mDM Supplement (15 días)**

| | Gr/100ml mDM stock | Gr/50ml mDM stock |
|---------------------|--------------------|-------------------|
| mDM stock | 100ml | 50ml |
| NaHCO ₃ | 0.3104 | 0.1552 |
| Glucose | 0.2500 | 0.1250 |
| Piruvic acid | 0.0137 | 0.0068 |
| BSA Fatty Acid Free | 0.6 | 0.3 |

Ajustar osmolaridad a 292-297 mOsm con H₂O miliQ

Filtrar con un filtro de 0.22µm

- **TALP Stock Media (1 mes)**

| | Gr /500ml H2O | Gr /250ml |
|---|---------------|-----------|
| NaCl | 3.33 | 1.665 |
| KCl | 0.119 | 0.0595 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.147 | 0.0735 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 0.0135 | 0.0068 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0.0255 | 0.0128 |
| Gentamicin | 0.015 | 0.0075 |
| Fenol Red | 0.005 | 0.0025 |

- **TALP suplemento (15 días)**

| | Gr/100ml TALP stock | Gr/50ml TALP stock |
|---------------------|---------------------|--------------------|
| TALP stock | 100ml | 50ml |
| NaHCO ₃ | 0.21 | 0.105 |
| Glucose | 0.09 | 0.045 |
| Piruvic acid | 0.002 | 0.001 |
| BSA Fatty Acid Free | 0.6 | 0.3 |
| Sodium Lactate | 170ul | 85ul |

Ajustar osmolaridad a 292-297 mOsm con H₂O miliQ

Filtrar con un filtro de 0.22µm

- **Medio SOF (15 a 45 días dependiendo de si continúa produciendo blastocistos)**

| | Nombre | Para 55 ml Aprox | Para 220ml Aprox |
|--|---|---------------------|---------------------|
| NaCl | Sodium chloride | 0.31465 g | 1.2586 g |
| KCl | Potassium chloride | 0.027 g | 0.108 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | Calcium chloride dehydrate | 0.01239 g | 0.04956 g |
| KH ₂ PO ₄ | Potassium phosphate monobasic | 0.0081 g | 0.0324 g |
| MgSO ₄ | Magnesium Sulfate | 0.005g | 0.02 g |
| NaHCO ₃ | Sodium bicarbonate | 0.10548 g | 0.42192 g |
| Rojo Fenol | Phenol red sodium salt | 0.00045 g | 0.0018 g |
| CH ₃ COCOONa | Sodium pyruvate | 0.01815 g | 0.0726 g |
| CH ₃ CH(OH)COONa | Sodium DL-lactate solution | 72 µl | 288 µl |
| BSA-FAF | Albumin from bovine serum | 0.4 g | 1.6 g |
| BME | BME Amino Acids Solution 50× | 100 µl | 400 µl |
| MEM | MEM Non-essential Amino Ac.Sn (100×) | 100 µl | 400µl |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ NatriCitrate | Sodium Citrate Tribasic 2H ₂ O | 0.005 g | 0.02 g |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ | <i>myo</i> -Inositol | 0.025 g | 0.1 g |
| SFB | Fetal Bovine Serum | 1.25 ml (2.5%) | 5 g |
| ATB | Antibiotic- antimicotic | 0.5ml | 2ml |

Ajustar osmolaridad a 269-279 mOsm con H₂O miliQ

Filtrar con filtro de 0.22µm

Inmunodetección de la proteína Oct4.

La proteína Oct4 es una proteína específica de la pluripotencia en células embrionarias de ratón. Las células pluripotentes son las células localizadas en la MCI del blastocisto. En caprino y ovino se desconoce si esta proteína será también marcadora de la pluripotencia de las células de la MCI.

La inmunodetección se realizó en mórulas de oveja obtenidas mediante fecundación *in vitro* y en blastocistos partenogénéticos de cabra. Se observó que en las mórulas de oveja no hay expresión de Oct4 (Fig.29), en la fotografía de Merge solo vemos la tinción de Hoechst. Esta falta de señal indicaría que las células de la mórula son totipotentes y no pluripotentes como ha sido observado en ratón.

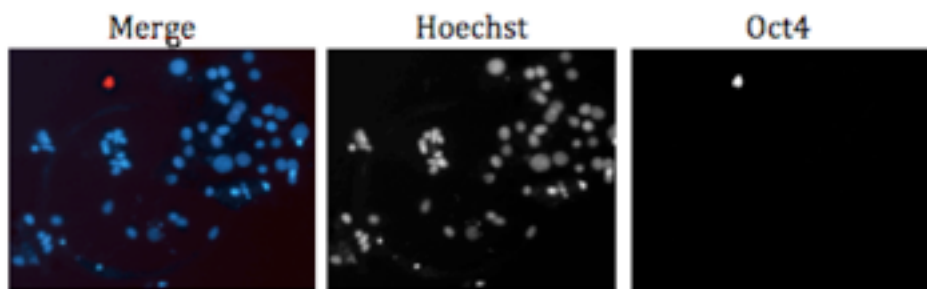


Fig. 29 | Inmunodetección de Oct4 en mórulas FIV de ovino. Utilizamos como anticuerpo primario *rabbit anti-Oct4* (Santa-Cruz Biothecnology, ref.: sc-9081) y *Alexa Fluor 594* (rojo) como anticuerpo secundario. No hay expresión de Oct4.

A diferencia de los blastocistos de cabra (Fig.30), que si vemos expresión de Oct4 en todos los núcleos de las células de la MCI (células pluripotentes) y del TE (células multipotentes). En cualquiera de los dos casos, no podemos utilizar la inmunodetección con Oct4 para poder diferenciar las células pluripotentes como era nuestro objetivo. No es un buen anticuerpo para las mórulas de oveja, ya que no hay expresión alguna en ninguna células. En los blastocistos de cabra tiene expresión en todas las células, y presumiblemente solo deberíamos ver expresión en las células pluripotentes de la MCI en este estadio, sin embargo la apariencia de todas las células es similar.

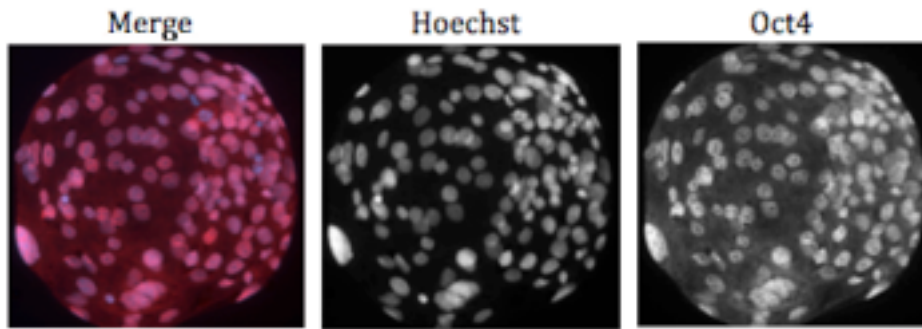


Fig.30 | Inmunodetección de Oct4 en blastocisto AP de cabra. Utilizamos como anticuerpo primario *rabbit anti-Oct4* (Santa-Cruz Biotechnology, ref: sc-9081) y *Alexa Fluor 594* (verde) como anticuerpo secundario. La expresión de Oct4 puede verse en todas las células de la MCI y TE, no se diferencian los dos tipos celulares.

PROCOLO INMUNODETECCIÓN NANOG

- 1. Fijación:** paraformaldehido 4%. 10-15 minutos RT.
- 2. Lavado:** PBS + 0'05% Tween 20
- 3. Permeabilización (Sol. Permeabilización):** 20 minutos RT
- 4. Lavado:** PBS + 0'05% Tween 20
- 5. Guardar en la nevera (Sol. Stock):** cámara húmeda y cerrar con parafilm.

Para continuar la inmunodetección:

- 6. Bloqueo (Sol. Bloqueo):** 2 horas RT.
- 7. Anticuerpo primario:** *Rabbit anti-Human Nanog* (cat. No 500-P236, Prepotech) dilución 1:400 (ovejas)/ 1:600 (cabras) en Sol. Bloqueo ON 4°C.
- 8. Lavados (Sol. Bloqueo):** 3 x 10 minutos.
- 9. Anticuerpo secundario:** 2 µl *anti-rabbit Alexa Fluor 594* (Molecular Probes) + 664 µl de Sol. Bloqueo 30 minutos RT.
- 10. Lavados(Sol. Bloqueo):** 3 x 10 minutos.
- 11. Hoechst 33258 (+ Sol. Bloqueo):** Hacer un lavado de 10 minutos RT.
- 12. Vectachield:** Hacer un lavado en Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) con 0,25% Hoechst 33258 (Invitrogen) y montar el portaobjetos (4 µl). Esperar a que se extienda el líquido, hacer presión con las pinzas y sellar con pinta uñas.

SOLUCIONES

- 1-** Solución de Fijación: 4% PFA
- 2-** Sol. Permeabilización: 0,1% Tritó + AS (0,2%)
- 3-** Sol. Stock: 0,01% Tw20 + AS (0,2%)
- 4-** Sol Bloqueo: 1% BSA + 0,05% Tw20 + AS (0,2%)