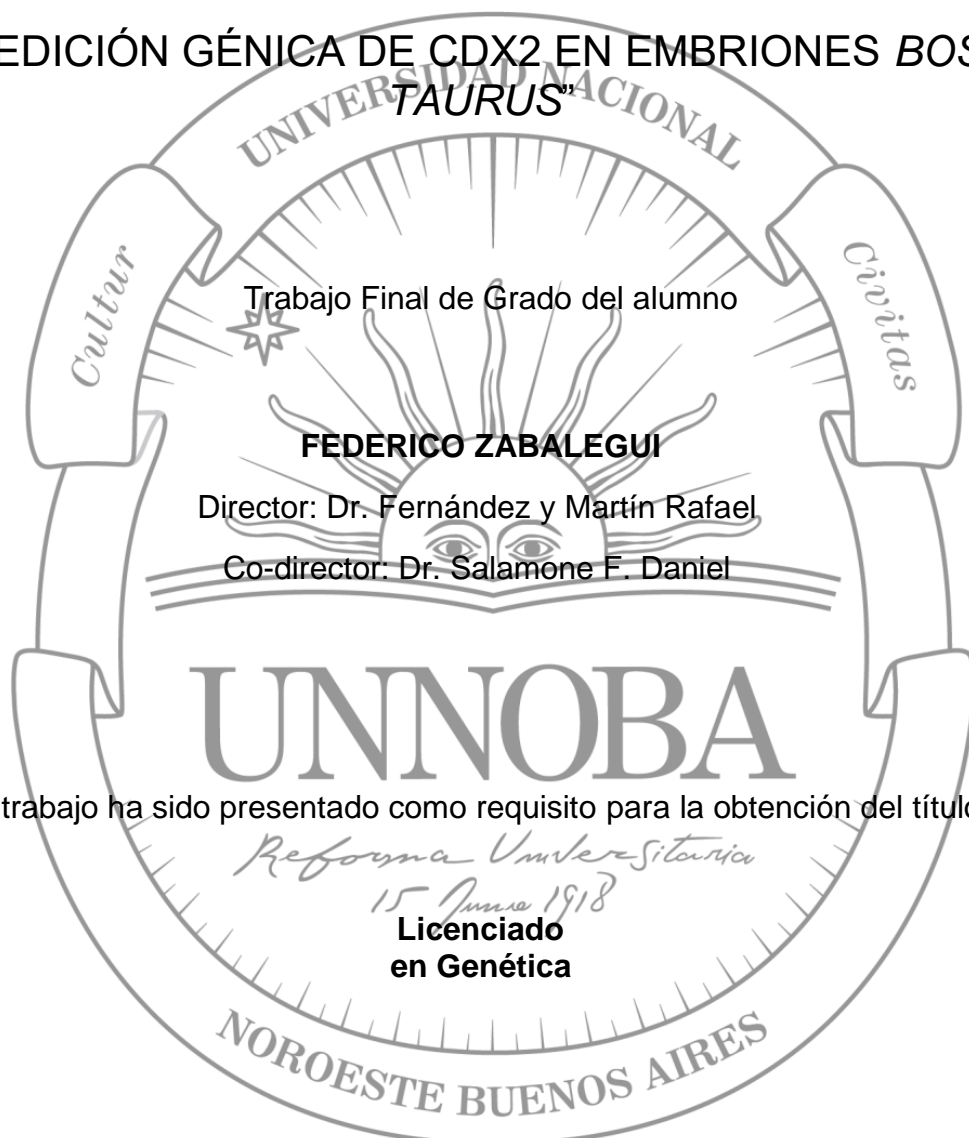


“EDICIÓN GÉNICA DE CDX2 EN EMBRIONES *BOS TAURUS*”



Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de

Carrera:

**Licenciatura en Genética**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

**Pergamino, 11 de Febrero del 2022**

## **Agradecimientos:**

Hoy concluye esta etapa tan importante de mi vida. Un periodo en el que aprendí en las aulas, pero también de mis compañeros y profesores, gente valiosa e inspiradora de la que me llevo hermosos recuerdos. Deseo darles este pequeño agradecimiento y decirles que nunca los olvidaré. Gracias por todas las experiencias vividas.

Agradezco, también, a la UNNOBA por brindarme la posibilidad de formarme en sus aulas. Me siento orgullosa de poder decir que fui parte de esta institución que tanto me ha dado.

Al laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía de la UBA, por abrirme sus puertas para poder realizar mi trabajo final de grado y concluir mis estudios.

Al Dr. Rafaél Fernández y Martín y Dr. Daniel Salamone por confiar en mí, abrirme las puertas de su laboratorio para realizar este trabajo bajo su dirección y brindarme las herramientas necesarias para poder finalizar esta etapa. Gracias Rafaél por compartir conmigo tus conocimientos y comprender que he tenido que viajar para poder realizar parte de este trabajo, a la vez que he tenido que cursar.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Animal, por estar siempre predisuestos a ayudarme y generar un buen ambiente de trabajo, especialmente a Gastón La Motta, quien con su predisposición y paciencia me ayudó en todas mis tareas de laboratorio desde el primer día.

Mi agradecimiento a toda mi familia, de sangre y de corazón, pero especialmente, a mis padres, Luis y Liliana, por haber hecho posible que hoy este finalizando esta carrera y que esté cumpliendo un sueño. Porque nunca dudaron de mis habilidades. También mi agradecimiento a mis hermanos, Santi y Flor.

A mis amigos. Todos. Por estar siempre para mí, incluso en los tiempos difíciles. Por sus palabras de apoyo, risas y locuras. Sin ustedes la vida no sería igual.

## Índice:

<b>1 - INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>1.1 Desarrollo embrionario preimplantario:</b> .....	9
<b>1.2 Expresión diferencial de genes:</b> .....	12
<b>1.3 Función de la folistatina:</b> .....	14
<b>1.4 Sistema CRISPR/Cas9: herramienta para la edición génica:</b> .....	14
<b>2 - Hipótesis y Objetivos</b> .....	18
<b>2.1 - Hipótesis:</b> .....	19
<b>2.2 – Objetivos:</b> .....	19
2.2.1- Objetivo general:.....	19
2.2.2- Objetivos específicos:.....	19
<b>3 - Materiales y Métodos</b> .....	20
<b>3.1 – Técnicas de Biología Molecular:</b> .....	21
3.1.1 Digestiones, ligación y transformaciones: .....	21
3.1.2- PCR (reacción en cadena de la polimerasa): .....	21
3.1.3- Electroforesis: .....	21
<b>3.2 – Sistema CRISPR/Cas9:</b> .....	22
<b>3.3 Base de datos y diseño de los guías:</b> .....	23
<b>3.4- Microinyección del sistema CRISPR/Cas9 en embriones bovinos:</b> .....	25
<b>4 - Resultados</b> .....	27
<b>4.1 - Reconstrucción de los guías:</b> .....	28
<b>4.2 - Edición la región esencial para la función de <i>Cdx2</i>:</b> .....	33
<b>4.3 - Desarrollo de los embriones bovinos microinyectados con el sistema CRISPR/Cas9 específico para <i>Cdx2</i>:</b> .....	34
<b>5 – Discusión</b> .....	36
<b>6 - Conclusión</b> .....	41
<b>7 - Referencias bibliográficas:</b> .....	43

## Abreviaturas utilizadas en este trabajo

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local (del inglés, Basic Local Alignment Search Tool).

C: Citocina

Cas9: Proteína 9 asociada a CRISPR (del inglés, *CRISPR associated protein 9*)

CRISPR: Repeticiones palíndromicas cortas intercaladas regularmente (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

crRNA: ARN CRISPR

DSB: Corte doble hebra de ADN (del inglés, *Double-Strand Break*)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos.

G: Guanina.

HR: Recombinación homóloga (del inglés, *Homologous Recombination*).

KO: Del inglés, *Knock-Out*.

kb: Kilo par de bases.

M: Molar

mL: Mililitro

mM: milimolar

NHEJ: Unión de extremos no homólogos (del inglés, *Non Homologous End Joining*).

ng: Nanogramo.

nt: Nucleótido.

ORF: Marco abierto de lectura (del inglés, *Open Reading Frame*).

PAM: Motivo adyacente protoespaciador (del inglés, *Protospacer Adjacent Motif*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

pb: Par de bases.

sgRNA: ARN guía

T: Timina.

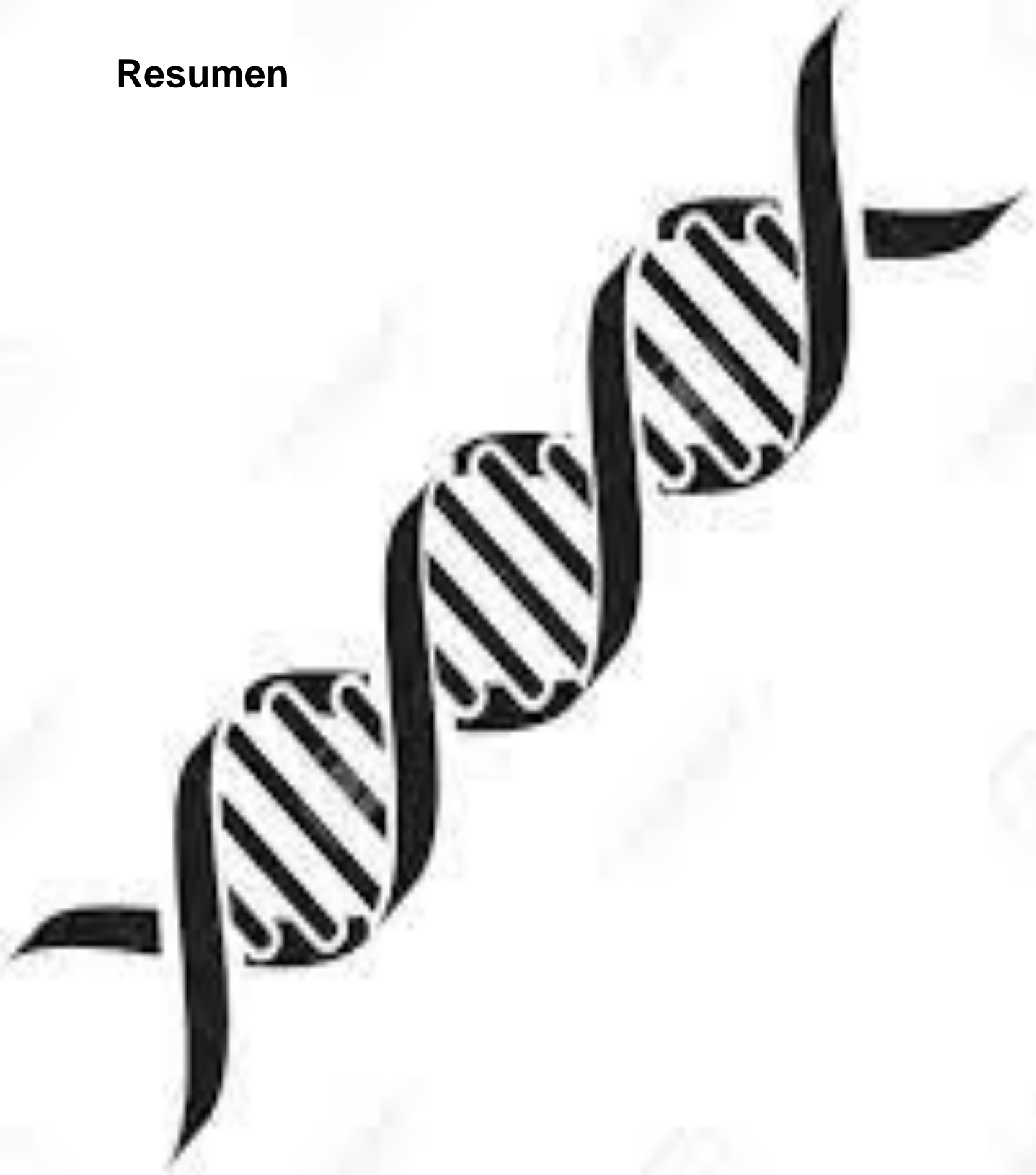
tracrRNA: ARN CRISPR trans-activador.

µg: Microgramo.

µL: Microlitro.

°C: Grados Celsius.

## Resumen



Resumen:

La edición génica en bovinos permite modificaciones genéticas precisas con aplicaciones múltiples, que van desde la mejora genética de los rasgos productivos hasta usos biomédicos. Los embriones bovinos son un modelo utilizado para estudiar los mecanismos fundamentales del desarrollo embrionario temprano ya que comparten muchas similitudes con los humanos y otros mamíferos. Además de generar información básica su importancia en la producción de alimentos justifica esfuerzos para mejorar su eficacia reproductiva. Un ejemplo de mejora es la corrección de las anomalías placentarias detectadas en los primeros embriones cultivados *in vitro*. La presencia de suero fetal bovino, rico en factores de crecimiento, genera cambios relativos en la transcripción de varios genes y provoca fenotipos anormales en el 25% de los fetos y neonatos producidos, que se engloban dentro del síndrome del ternero grande -(abreviado LOS del inglés, *Large Offspring Syndrome*). En los embriones de mamíferos, la primera diferenciación celular se da en la transición de mórula a blastocisto, cuando se forma el linaje trofoectodermo (TE) y macizo celular interno (ICM), eventos celulares que ocurren en los primeros días post fecundación y están en los orígenes de las anomalías en el desarrollo embrionarios descritas por LOS.

En las primeras etapas del desarrollo embrionarios el producto de los genes: *Cdx2*, *Eomes*, *Sox2* y *Gata3* resultan claves para la proliferación de TE y la implantación. En embriones bovinos, *Cdx2* se expresa a partir de las 8 células y se localiza exclusivamente en TE, y aunque resultó no ser esencial para el establecimiento, si lo es para el mantenimiento. La modulación de la expresión de genes claves para el desarrollo embrionario preimplantatorio, como *Cdx2*, permitirá dirigir la primera diferenciación celular con el objetivo de mejorar el desarrollo del trofoectodermo, y finalmente, la placentación de los embriones. La modificación génica precisa de animales era difícil y requería tiempos prolongados, pero en los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas para la edición génica, como CRISPR/CAS9.

El sistema CRISPR/Cas9 tiene la capacidad de reconocer la secuencia diana del DNA específica a lo largo del genoma e inducir una ruptura de doble cadena en ese *locus* mediante dos dominios nucleasas presentes en la proteína CAS9. La principal ventaja del sistema es la posibilidad de editar diferentes secuencias de DNA cambiando la secuencia de 20nt del sgRNA, siendo la misma enzima CAS9 adecuada para todas las secuencias, haciendo así al sistema versátil y económico. En base a lo mencionado, el objetivo general de este trabajo fue estudiar el efecto del *knock-out* del gen *Cdx2* a través de CRISPR/CAS9 en estadios preimplantatorios de embriones bovinos.

Con este fin, se diseñaron dos guías sobre el primer exón traducido de este gen, el cual contiene las secuencias que codifican los aminoácidos que conforman el sitio activo de la enzima. Esperamos que por la acción de CAS9 y estas guías se libere el fragmento interno, y se genere un alelo de pérdida de función, reconocible por la variación en la movilidad de un amplicón de esta región por PCR.

Las secuencias específicas de los guías fueron sintetizadas y clonadas en plásmidos que las exprese, pU6-sgRNA. Los plásmidos resultantes fueron corroborados por secuenciación. Estos plásmidos, junto al que expresa CAS9, fueron inyectados en embriones tempranos bovinos, y no se registraron variaciones en su desarrollo preimplantatorio ni en su calidad embrionaria. A pesar de tener dos pares de oligonucleótidos flanqueando la región editada, no conseguimos amplicones para evidenciar la edición.

Este trabajo presenta evidencia de que es factible, sencillo y económico la reconstrucción de guías específicos para una secuencia determinada lo que permite la obtención de *knock-out* utilizando el sistema CRISPR/Cas9 en cualquier especie animal. Este sistema puede permitir el estudio de las decisiones sobre el destino de las células embrionarias tempranas en embriones de mamíferos, así como también diseñar nuevas estrategias que pueden mejorar el desarrollo del trofotodermo.

# 1 - INTRODUCCIÓN





## 1 - Introducción:

La edición del genoma es el cautivador enfoque de la ingeniería genética con un enorme potencial en la aplicación biomédica de la manipulación de funciones genéticas. La edición genética en bovinos permite modificaciones genéticas precisas con aplicaciones múltiples que van desde la mejora genética de los rasgos productivos hasta usos biomédicos. Hasta ahora la investigación se ha centrado fundamentalmente en mejorar la eficiencia de la productividad alimentaria (por ejemplo, carne y leche), la salud y el bienestar animal (sin cuernos y enfermedades) y generar descendencia exclusivamente masculina (Singh & Ali, 2021). Los embriones bovinos son un modelo atractivo para investigar los mecanismos fundamentales del desarrollo embrionario temprano, ya que comparten muchas similitudes con humanos (Adjaye et al., 2007; Krisher, 2012).

Un ejemplo son las anomalías placentarias detectadas en embriones cultivados *in vitro* (Li et al., 2019; Young et al., 1998). La utilización de suplementos de sueros, ricos en factores de crecimiento, en el cultivo *in vitro* de embriones se ha utilizado históricamente para estimular la formación de blastocistos (Datta & Kontomichalou, 1965). Varios informes experimentales sugieren que el suero puede inducir síndrome del ternero grande, -(abreviado LOS del inglés, *Large Offspring Syndrome*) en aproximadamente el 25% de los fetos bovinos (Chen et al., 2015; Young et al., 2001). El agregado suero fetal bovino durante el cultivo de embriones acelera el desarrollo embrionario y mejora las tasas de blastocistos para el día 6 pero disminuye la tasa de supervivencia embrionaria (Harrison & Holm, 1995; Thompson et al., 1998). LOS engloba a un grupo de fenotipos anormales que ocurren en placentas, fetos, y neonatos bovinos y ovinos producidos por tecnologías de reproducción asistida- (abreviado ART del inglés, *Assisted Reproductive Technology*). Las ART se utilizan para maximizar las capacidades reproductivas de animales con gran mérito genético. Pese a que *in vitro* son mantenidos un corto período de tiempo en comparación con toda la gestación, las características de LOS incluyen sobrecrecimiento, lenguas agrandadas, hernias umbilicales, malformaciones musculares y esqueléticas, crecimiento anormal de órganos, etc. Las causas de LOS son los cambios relativos en la transcripción de varios genes importantes para el desarrollo inducidos por factores de crecimiento presentes en el suero fetal bovino (Wrenzycki et al., 1999, 2001).

### 1.1 Desarrollo embrionario preimplantario:

El encuentro entre las gametas femeninas y masculinas ocurre, in vivo, en el oviducto materno. En el momento en que los espermatozoides se movilizan por el

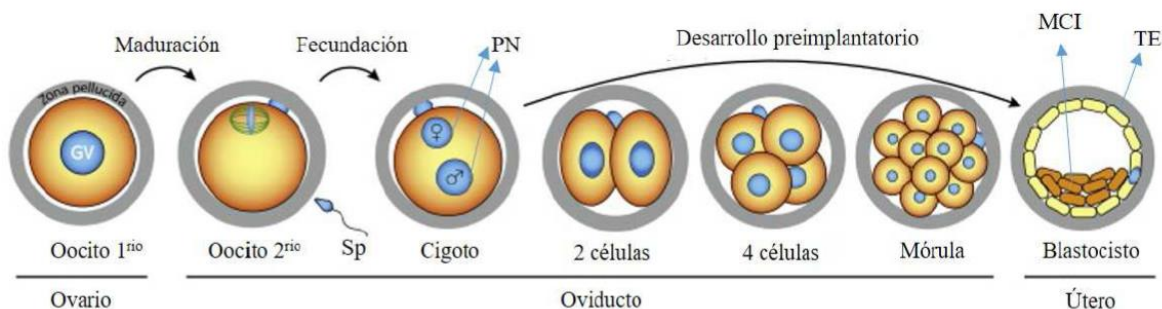
tracto femenino sufren modificaciones y adquieren la capacidad para fecundar un ovocito maduro, proceso llamado capacitación espermática. Durante la misma ocurre la pérdida parcial del revestimiento de la cabeza y la reacción acrosómica, apareciendo pequeños poros a este nivel que liberan las enzimas necesarias para atravesar las barreras de protección del ovocito. Los mismos atraviesan el cúmulo expandido y la zona pelúcida para fusionar su membrana con la del ovocito. La fusión de ambas células induce una serie de oscilaciones de calcio intracelular (Dobrinisky, 1992), que generaran procesos como la extrusión de los gránulos corticales y la activación del ovocito (Williams, 2002). La liberación de las enzimas que se encuentran en los gránulos corticales modifica las proteínas de la zona pelúcida, una capa de glicoproteína que rodea al ovocito. Estas modificaciones impiden la entrada de más espermatozoides y, consecuentemente, la polispermia. Con la activación, inducida por las oscilaciones de calcio, el ovocito saldrá del arresto en metafase II y finalizará la meiosis, con la extrusión del segundo cuerpo polar. El óvulo con el espermatozoide, el cigoto, contiene ambos pronúcleos, femenino y masculino (Figura 1). Posteriormente ocurrirá la fusión de los pronúcleos, proceso conocido como singamia, que dará lugar a la formación de la primera célula diploide con la carga cromosómica completa. Esta célula es totipotencial, tiene la capacidad para diferenciarse en todos los tipos celulares posibles (Chow, 1997).

A partir de la formación del cigoto, el desarrollo del embrión y de los tejidos extraembrionarios requieren de una precisa coordinación de cambios epigenéticos que restringen o permiten la expresión de determinados genes en ciertos tipos celulares. En embriones de mamíferos, la primera diferenciación celular se da en la transición de mórula a blastocisto, cuando se forma el linaje macizo celular interno (ICM) y trofotodermo (TE), que originarán el feto y los tejidos extraembrionarios respectivamente (Figura 1). Estos eventos ocurren en los primeros días, y están en los orígenes de las anomalías en el desarrollo embrionario descritas por LOS (Goissis & Cibelli, 2014).

El inicio del desarrollo embrionario preimplantatorio ocurre en el oviducto y depende de las proteínas y ARNs almacenados durante la maduración ovocitaria, ya que el embrión temprano presenta un bloqueo transcripcional. El cigoto se divide por mitosis, sin aumentar su tamaño, dando lugar a 2 células hijas llamadas blastómeras. El ciclo de división consiste en una fase de replicación de ADN seguida inmediatamente por la mitosis, sin prácticamente fases de crecimiento (Fases Gap 1 y Gap 2) y se repite de forma sucesiva dando lugar a un embrión de 4, 8 a 16 células (Barnes & Eystone, 1990). En los embriones bovinos de 8 a 16 células ocurre una remodelación global de la estructura cromatínica, y se vuelven transcripcionalmente activos (Augustin et al., 2001). En paralelo ocurre la

degradación de los ARNs y proteínas de origen materno, por lo que la regulación de las siguientes etapas del desarrollo es dirigida por el genoma del embrión, aunque esta influenciado por su entorno (Graf et al., 2014).

Hacia el día 5 del desarrollo embrionario, las blastómeras se compactan y se hace imposible diferenciarlas individualmente. Este estadio del embrión se conoce como mórula. En dicho estadio se establecen uniones estrechas entre las blastómeras, las células se polarizan y se inicia la primera diferenciación celular. Las células localizadas en la periferia del embrión producen secreciones formando una cavidad llamada blastocele, dando lugar a la formación del blastocisto. En el blastocisto conviven 2 subpoblaciones celulares que difieren morfológica y transcripcionalmente: el macizo celular interno (ICM), que dará lugar a la formación del embrión propiamente dicho, y el trofoblasto (TE), que generará las estructuras extraembrionarias (Degrelle et al., 2005; Ozawa et al., 2012). Durante este estadio, el embrión bovino terminará su tránsito por el oviducto, para llegar finalmente al útero materno como mórula tardía o blastocisto (Figura 1). Una vez alcanzado el útero, el embrión eclosiona y rompe la barrera glicoproteica de protección que lo rodea, la zona pelúcida. Después de romper la zona pelúcida, el embrión bovino crece adquiriendo inicialmente una forma ovoide, después tubular y finalmente filamentosa, por la elongación del TE (Degrelle et al., 2005). La zona pelúcida se había formado durante la transición de folículo primario a secundario, donde las células de la granulosa secretan proteínas y polisacáridos para formar dicha cubierta glicoproteica que rodea al ovocito (Chow, 1997). En este período el TE cumple roles fundamentales: 1) para el reconocimiento de la preñez por parte de la madre a través de la secreción de interferón tau (IFN-Tau) (Bazer et al., 2008), y 2) en la adhesión e implantación del embrión al endometrio materno. Hacia el día 21 del desarrollo embrionario el TE forma la porción fetal de la placenta (Chavatte-Palmer et al., 2012).



**Figura 1:** Esquema del desarrollo preimplantatorio. El ovocito 2río maduro es fecundado por el espermatzoide (Sp) para formar el cigoto, que iniciará el desarrollo preimplantatorio

en el oviducto. En el estadio de blastocisto, donde se diferencia el macizo celular interno (ICM) y el trofoectodermo (TE), el embrión alcanza el útero materno. PN, pronúcleos. Imagen modificada (Zhou & Dean, 2015).

## 1.2 Expresión diferencial de genes:

Los mecanismos que controlan la diferenciación embrionaria han sido muy estudiados en ratón, debido a la utilización y disponibilidad de modelos de disrupción de genes (*Knock Out* o *KO*). Además, es importante generar información básica ya que el bovino es una especie pecuaria importante para la producción de leche y carne. Las nuevas herramientas de biología molecular han facilitado la realización de *knock-out* en otras especies, con diferencias en la expresión espacio-temporal de los factores involucrados en las vías de diferenciación celular entre el ratón y otras especies, como es el caso del bovino.

Para lograr la correcta diferenciación a los linajes ICM y TE, se requiere de una dinámica regulación de la expresión génica, tanto a nivel temporal como espacial. Los factores de transcripción *Cdx2*, *Eomes*, *Tcfap2c*, *Elf5*, *Ets2*, *Sox2* y *Gata3* han sido descritos como los primeros actores clave en el mantenimiento del linaje del trofoectodermo en ratones, ya que los estudios de pérdida de función resultan en 1) la pérdida de células del TE en proliferación y 2) la incapacidad para derivar células madre trofoblásticas (TS) (Avilion et al., 2003; Donnison et al., 2005; Georgiades & Rossant, 2006; Home et al., 2009; Kuckenberget al., 2010; Ralston et al., 2010; Strumpf et al., 2005).

En embriones de ratón, la primera diferenciación celular es dirigida por una expresión génica antagonista entre *Oct4* y *Cdx2*. Si bien inicialmente ambos se expresan de forma ubicua, en esta especie, el mecanismo de regulación implica la represión de la expresión de *Oct4* por parte de *Cdx2* en el TE e inversamente, de *Cdx2* en el ICM, lo que da lugar en el estadio de blastocisto tardío a la localización exclusiva de la proteína OCT4 en el ICM y proteína CDX2 en el TE (Rossant, 2004). En el caso de los bovinos, *Cdx2* se expresa a partir de las 8 células y también se localiza exclusivamente en el TE del blastocisto, aunque se demostró que no es esencial para establecimiento, pero sí para su mantenimiento e integridad (Berg et al., 2011). En esta especie el mecanismo de diferenciación no requiere la restricción de la proteína OCT4 al ICM del blastocisto, detectándose altos niveles de ARN mensajero de OCT4 en el TE de embriones bovinos *in vitro* en el día 11, aún en presencia de transcritos de *Cdx2* (Berg et al., 2011). La alta expresión de *Oct4* en el TE de blastocistos bovinos tardíos se correlaciona con un retraso en la

diferenciación a TE y al mantenimiento de una población de células pluripotentes en este tejido, que podría ser consecuencia del desfase temporal que se observa entre el arribo del blastocisto al útero materno y su implantación (Degrelle et al., 2005). Entonces, la presencia de la proteína OCT4 no sería necesaria en el TE, ya que su implantación ocurre inmediatamente luego de la formación del blastocisto. En estadios más avanzados, como embriones elongados, la proteína OCT4 parece estar específicamente localizada en el epiblasto de embriones bovinos (Degrelle et al., 2005; Vejlsted et al., 2005).

Para lograr la diferenciación celular es necesaria una correcta regulación en la expresión génica y la apropiada disposición espacial de las blastómeras. Todas las blastómeras de embriones de 8 células son equivalentes en cuanto a su disposición, en cambio, en embriones de 16 células pueden distinguirse células “internas” y células “externas”, las cuales presentan diferente contacto célula - célula lo que establece la polarización de las células externas. La vía de regulación Hippo es una red muy amplia de factores de transcripción que regulan la proliferación celular y diferenciación en respuesta a la interacción y comunicación entre blastómeras (Wicklow et al., 2014). La misma participa en el silenciamiento del gen *Sox2* y la inducción del gen *Cdx2* en células de la capa externa y del proceso inverso en células internas, para lograr la especificación del linaje. Además, esta vía, en conjunto con la polarización de las blastómeras, permite la expresión de factores de pluripotencia exclusivamente en las células de ICM hasta que ocurre la implantación embrionaria.

El factor de transcripción *Tfap2c*, presente desde muy temprano en el desarrollo embrionario, regula la expresión de *Cdx2*. El mismo participa en el establecimiento de la polaridad de las células, diferenciación celular y la formación del blastocele, cavidad de la blástula la cual se encuentra rellena de líquido que se forma con la separación de las blastómeras (Lee et al., 2016). En los embriones de ratón, este factor de transcripción promueve la diferenciación hacia el trofotodermo mediante 2 mecanismo: 1) induce la expresión de *Cdx2* en estadios de 2-4 células e 2) inhibe la expresión de la vía de señalización Hippo en las células externas (Cao et al., 2015). La vía de regulación de *Cdx2* mediada por Hippo parece estar conservada en bovinos (Berg et al., 2011).

Ambas proteínas, CDX2 y OCT4, se expresan de forma ubicua alrededor de la etapa de 8 células en embriones bovinos. Hay 4 indicios que apuntan a la necesidad de *Cdx2* para comprometer el linaje a TE. El primero es que tras la cavitación en la etapa posterior a 32 células, se produce una restricción de la proteína CDX2 a las células externas (Dietrich & Hiiragi, 2007; Ralston & Rossant, 2008) asociado con el compromiso del trofotodermo. El segundo es que tras la inactivación funcional

de *Cdx2* (Strumpf et al., 2005), los embriones forman blastocistos tempranos, pero no pueden mantener su blastocele, ya que se pierde la integridad epitelial del trofotodermo. Las células apoptóticas de TE y los embriones no se implantan. El tercero, las células madre del trofoblasto (TS), comprometidas con el linaje placentario, pueden derivarse de embriones normales (Tanaka et al., 1998), pero no de embriones mutantes de *Cdx2* (Strumpf et al., 2005). El cuarto es que el trabajo en células madre embrionarias (ES) presta apoyo a un papel de mantenimiento de *Cdx2* para el linaje TE. Estos cuatro indicios apuntan a un papel claro para *Cdx2* en el compromiso de TE, pero también sugieren que *Cdx2* no es esencial para la especificación inicial del linaje TE.

### **1.3 Función de la folistatina:**

Estudios funcionales han revelado que la folistatina derivada de la madre es esencial para el desarrollo temprano en los embriones bovinos antes de su implantación y que la suplementación exógena durante el cultivo *in vitro* mejora la capacidad de desarrollo de los embriones (Ashry et al., 2015, 2018; Zhenhua et al., 2017). Los blastocistos producidos *in vitro* tratados con folistatina muestran un mayor número de células de trofotodermo y una mayor expresión del ARNm de *Cdx2*. Los niveles elevados de *Cdx2* se asocian con tasas más altas de preñez después de la transferencia de embriones (El-Sayed et al., 2006). Contrariamente, la transferencia de blastocistos *Cdx2 KO* da como resultado embriones poco alargados en el día 14 del embarazo debido a la proliferación reducida de células TE (Berg et al., 2011). En conjunto, los hallazgos experimentales demuestran que *Cdx2* es un determinante molecular de la calidad de los blastocistos y de la elongación del embrión bovino.

### **1.4 Sistema CRISPR/Cas9: herramienta para la edición génica:**

En los últimos años se han desarrollado herramientas de biología molecular, como son las nucleasas programables sitio-específicas, capaces de inducir cortes de doble cadena que provocan modificaciones puntuales en secuencias específicas del genoma. Estas herramientas permiten generar alelos *knock-out* en muchas especies, sin la necesidad de desarrollar células madres embrionarias, lo que permite estudiar en nuevas especies la diferenciación de los linajes ICM y TE, como es el caso del bovino.

Las tecnologías que han surgido en los últimos años para la edición del genoma incluyen las nucleasas con dedos de zinc, ZFNs -(del inglés, *Zinc Finger Nucleases*), las nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción, TALENs -(del inglés, *Transcription Activator-like Effector Nucleases*) y repeticiones palíndromicas cortas intercaladas regularmente, CRISPR -(del inglés, *Clustered Regularly Interspaced*

*Short Palindromic Repeats*) guiadas por ARN. Las dos primeras tecnologías son quimeras que fusionan un dominio de corte (*FokI*) y dominios de unión a ADN modulares para inducir rupturas de doble cadena de ADN (DBS) en loci genómicos específicos. Por el contrario, CAS9 -(del inglés, *Crispr Associated 9 Protein*), es una nucleasa guiada por pequeños ARN a través del emparejamiento de bases con el ADN blanco. Esto facilita el diseño de la especificidad e incluso permite modificaciones en simultaneo combinando varias moléculas de ARN guía con la proteína CAS9 (Ran et al., 2013).

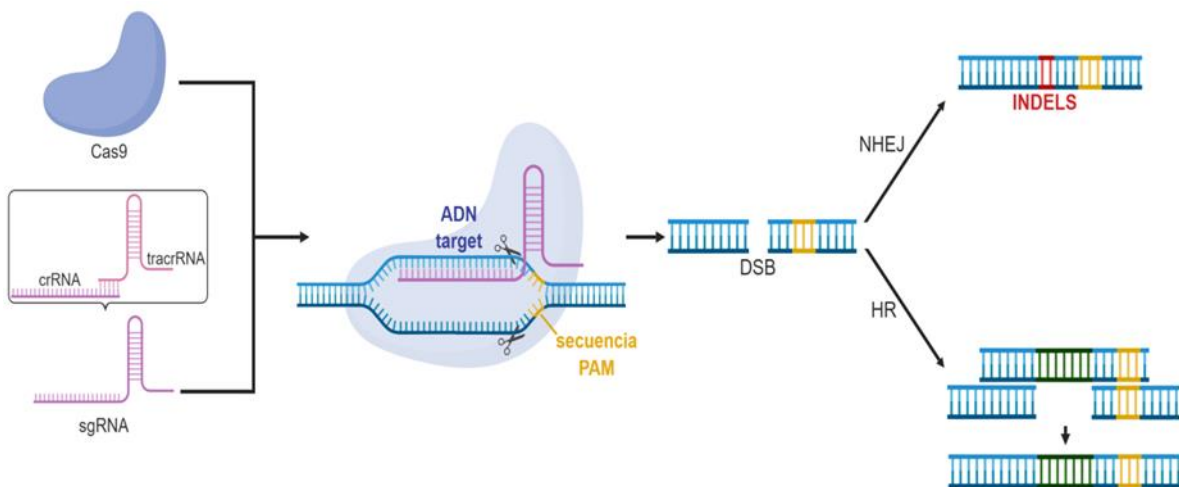
El sistema CRISPR fue reportado como un mecanismo de defensa adquirido guiado por ARN en bacterias y arqueobacterias contra elementos genéticos extraños, como virus o fagos, de modo de responder y eliminar estos elementos genéticos invasores (Mojica et al., 2005). Este sistema proporciona una forma de inmunidad adquirida a las bacterias en la que segmentos cortos de DNA extraño se incorporan en el genoma bacteriano en un *locus* específico entre secuencias repetidas, lo cual sirve como memoria de exposiciones pasadas en su linaje. Los fragmentos almacenados se transcriben como ARN cortos que, al asociarse con la nucleasa CAS9 la bacteria la utiliza para dirigir la degradación de ácidos nucleicos extraños. Existen diferentes sistemas CRISPR, pero debido a su simplicidad, la clase II, derivado de *Streptococcus pyogenes*, es la más utilizada para la edición génica (Lamas-Toranzo et al., 2017). El sistema consta de 3 componentes (Figura 2): (1) la proteína CAS9, (2) el ARN CRISPR (crARN), que contiene la secuencia guía de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia *target*, y un (3) ARN CRISPR trans-activador (tracrARN), el cual es parcialmente complementario al crARN, reconoce y se asocia a CAS9 (Kararoudi et al., 2018). Para simplificar el sistema, se fusionó el crARN y el traARN en un ARN guía único, el sgARN, que dirige a Cas9 al sitio *target* compuesto por 20 nucleótidos adyacentes a una secuencia PAM -(del inglés, *Protospacer Adjacent Motif*). La secuencia PAM tiene una composición 5'-NGG-3', donde G es guanina y N es cualquier desoxirribonucleótido.

CRISPR/Cas9 tiene la capacidad de reconocer la secuencia diana de DNA específica a lo largo del genoma e inducir una ruptura de doble cadena (DSB) de DNA en ese *locus* mediante dos dominios nucleasa presentes en la proteína CAS9 (Lamas-Toranzo et al., 2017). Después de la ruptura del DNA, las células poseen dos mecanismos de reparación: (1) mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o (2) recombinación homologa (HR). En el caso de la unión de extremos no homólogos es propensa a errores y puede conducir a mutaciones por inserción/eliminación aleatoria de unos pocos nucleótidos, conocidas como indels, en el proceso de reparación. Si el *target* de CRISPR/Cas9 se encuentra dentro del marco abierto de lectura -(ORF, del inglés *Open Reading Frame*) de un gen en particular, el indel puede interrumpir el ORF si no es múltiplo de 3 al cambiar el marco de lectura. Por lo tanto, CRISPR/Cas9 permite la generación células *knock-out* o *KO* con una alta eficiencia y en un solo paso. Además, se pueden utilizar 2 sgARN en regiones próximas del DNA para favorecer la delección entre los cortes. Por otro lado, el DBS puede ser reparado por HR, lo que puede reconstituir la secuencia original o, si se proporciona un molde de recombinación, insertar una secuencia determinada, generando un *knock-in* (KI) (Lamas-Toranzo et al., 2017).

Si incluimos dos guías flanqueando una región génica que será traducida, con cierta frecuencia se perderá el fragmento interno, generándose de esta forma un alelo de pérdida de función y reconocible por la variación en la movilidad de un amplicón de esta región por PCR.

La principal ventaja del sistema CRISPR/Cas9 sobre las demás tecnologías nucleasas, es la posibilidad de editar diferentes secuencias de DNA cambiando la secuencia de 20 nt del sgRNA, siendo la misma enzima *CAS9* adecuada para todas las secuencias. Esto genera que el sistema sea sumamente versátil y económico. (Ran et al., 2013).

El corte sitio específico inducido por *CAS9* será reparado por la propia maquinaria celular, existiendo la posibilidad de introducir pequeñas mutaciones en la secuencia que lleven a un corrimiento en el marco de lectura y consecuente al *knock out* de la función génica. Alternativamente, el sistema se le puede proveer de un “DNA donador” que presente homología a las secuencias lindantes al sitio de corte, la reparación de la ruptura podrá ser mediada por reparación dirigida por homología (HDR) y dará lugar a la generación de mutaciones puntuales y precisas o la incorporación de transgenes (Joung & Sander, 2013).



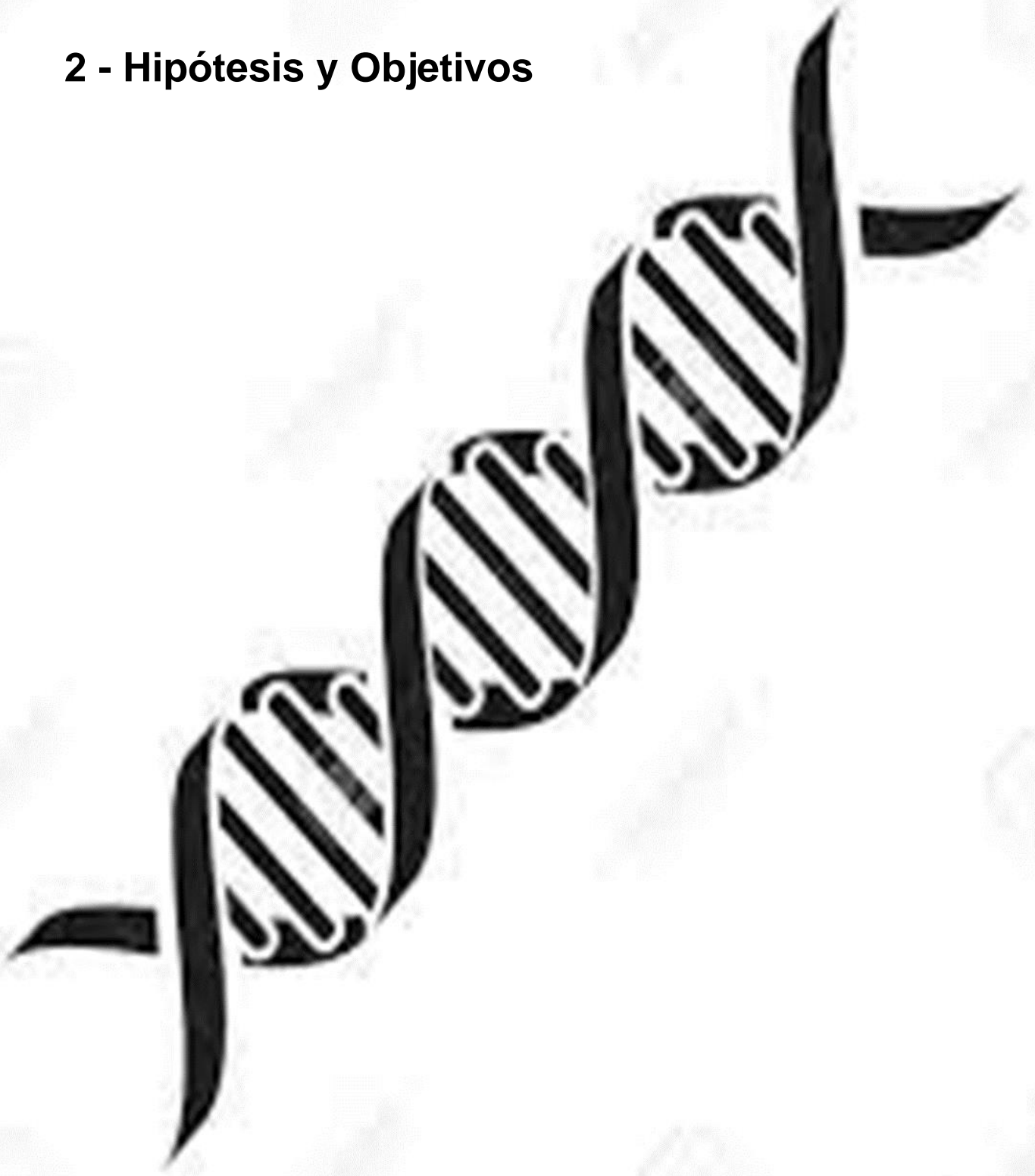
**Figura 2:** Tecnología de CRISPR/Cas9. La endonucleasa Cas9 se asocia a un ARN guía (sgRNA), el cual dirige el corte doble hebra a una secuencia *target* en el ADN. El corte doble hebra (DSB) puede repararse por unión de extremos no homólogos (NHEJ), lo que puede generar indels, o a través de la recombinación homóloga (HR), lo que puede permitir la inserción de un fragmento de ADN. Imagen creada con BioRender.

Las alteraciones en la expresión génica que dan lugar al desarrollo anormal de los



linajes ICM y TE se ven asociadas a fallas de implantación y en desarrollo normal de la placenta que derivan, con alta frecuencia, en pérdidas de gestación. Por esto, comprender los mecanismos que dirigen la diferenciación celular en embriones preimplantatorios resulta importante para generar nuevas estrategias que permitan la producción de embriones con alto potencial de generar y mantener la preñez. En este proyecto se estudiará el efecto del *knock-out* del gen *Cdx2* en cultivos celulares para luego con los guías apropiados inyectar cigotos y determinar el desarrollo preimplantatorio de embriones bovinos.

## 2 - Hipótesis y Objetivos



## 2.1 - Hipótesis:

La pérdida de función del gen *Cdx2* en bovino afecta la primera diferenciación celular y el desarrollo embrionario preimplantatorio.

## 2.2 – Objetivos:

### 2.2.1- Objetivo general:

Estudiar el efecto del *knock out* del gen *Cdx2* a través de CRISPR/CAS9 en estadios preimplantatorios de embriones bovinos.

### 2.2.2- Objetivos específicos:

- Diseñar guías para el sistema CRISPR-CAS9 frente a la región 5' del gen *Cdx2*.
- Evaluar la eficiencia de los guías en fragmentos de DNA con el sistema CRISPR-CAS9.
- Obtener clones de células bovinas con alelos de pérdida de función del gen *Cdx2*.
- Evaluar la eficiencia en embriones bovinos.

### 3 - Materiales y Métodos



### 3- Materiales y métodos:

#### 3.1 – Técnicas de Biología Molecular:

##### 3.1.1 Digestiones, ligación y transformaciones:

Se utilizaron digestiones y ligaciones de diferentes enzimas según las recomendaciones de los fabricantes, NEB, Promega y Fermentas entre otros.

Para la transformación se utilizó la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  competentes preparadas con sales de rubidio (Hanahan, 1983). Se descongela un vial de células en hielo y se mezcla con los ácidos nucleicos (ligaciones o plásmidos). Se incuban un mínimo de 5 minutos en hielo, para luego exponerlas a un shock térmico de 42°C durante 45 segundos. Después se vuelven a incubar en hielo otros 5 min. Luego se les agregó 1,00 mL de medio de cultivo LB fresco (Sambrook et al 1989), y se dejaron recuperando durante 40 minutos a 37°C antes de sembrar en medio con ampicilina (100 mg/L)

##### 3.1.2- PCR (reacción en cadena de la polimerasa):

Se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante de la Taq polimerasa (INBIO Highway) en un termociclador MultiGene OptiMax (Labnet). Se utilizaron dNTP de Fermentas. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

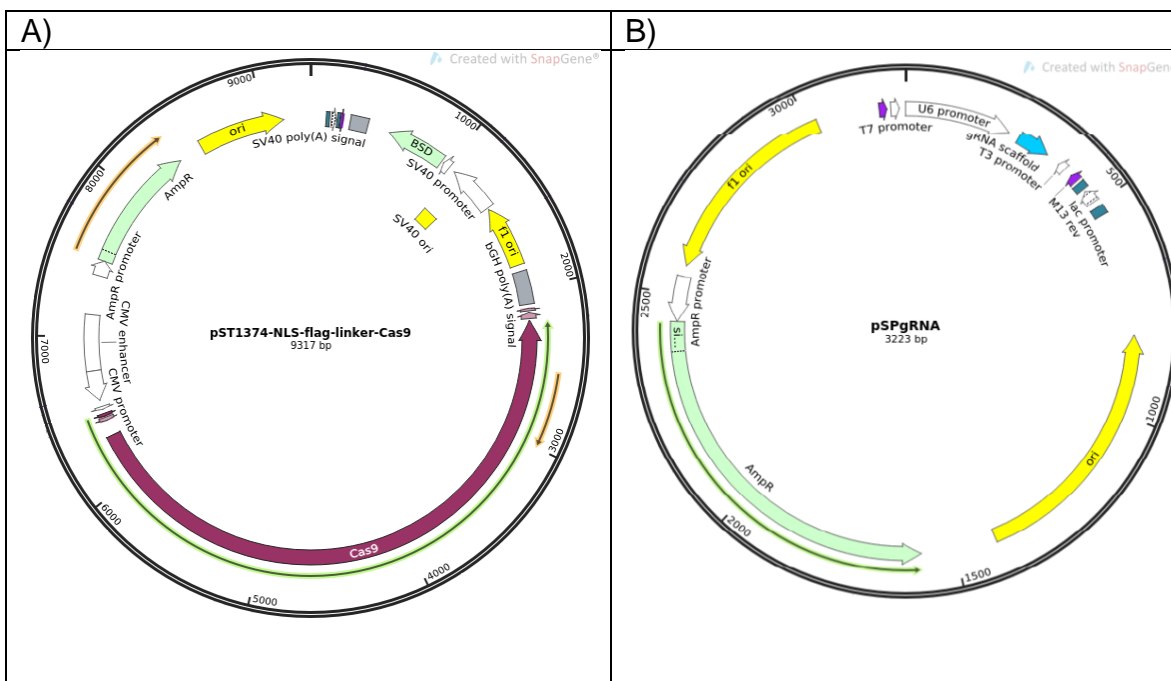
A los embriones microinyectados con el sistema CRISPR/Cas9 se los colectan de la placa de cultivo con el mínimo volumen bajo lupa estereoscópica y se colocan en 5  $\mu$ L de la solución de lisis (0,2% SDS, 0.05 mg/ml Proteinasa K y 1X PCR-buffer) donde se incuban por 1 hora a 55°C, para luego tratar durante 10 min a 95°C lo cual inactiva la proteinasa K utilizando el termociclador. Los 5  $\mu$ L del producto de la lisis se utilizó para amplificar el fragmento del gen *Cdx2*, y de esta manera, observar mediante una electroforesis si fue deletado. Para esto primero se realiza la PCR externa con los oligonucleótidos externos en un volumen final de 20  $\mu$ L, de los cuales 15  $\mu$ L eran de mix PCR y 5  $\mu$ L de lisis de embrión. Para la PCR interna, se utilizó 15  $\mu$ L de mix de PCR que contenía los oligonucleótidos internos a la cual se le agregó 1 $\mu$ L del producto de la PCR externa. Las condiciones utilizadas para la PCR externa fueron 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 10 segundos a 55°C, y 30 segundos a 72°C, precedidos por 2 minutos a 94°C y seguidos de 2 minutos de elongación final a 72°C. Las condiciones para la PCR interna fueron las mismas.

##### 3.1.3- Electroforesis:

Se realizó una separación con un campo eléctrico en geles de 1% y 2% agarosa en TAE con bromuro de etidio (Sambrook, Joseph, Edward F. Fritsch, and Tom Maniatis. Molecular cloning. Vol. 1. No. 7.58. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989). Se utilizó el patrón de peso molecular 1kb DNA Ladder (Solis BioDyne).

### 3.2 – Sistema CRISPR/Cas9:

Se utilizó el plásmido pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 o pCMVCAS9 (Addgene plásmido #44758, 7) que codifica la endonucleasa Cas9 con codones optimizados para mamíferos, bajo el control transcripcional del promotor CMV que permite la expresión en células de mamíferos (Figura 3A). Se utilizó el plásmido pSPgRNA o pU6sgRNA (Addgene, plásmido #47108, 8) para expresar los sgRNAs que expresan los guías bajo el promotor de U6 un promotor de la polimerasa III capaz de sintetizar RNA de pequeño tamaño (Figura 3B). Este plásmido tiene dos sitios de corte *BbsI* que facilita la integración de la región que proporciona especificidad al guía.



**Figura 3: Esquema de plásmidos.** A) Plásmido pCMVCas9, el cual codifica la endonucleasa Cas9 optimizado para codones humanos que se encuentra bajo el promotor CMV. Contiene gen de resistencia a blasticidina. B) Plásmido pU6-sgRNA, el cual codifica el ARN guía. Contiene el promotor U6 y secuencia scaffold. También contiene gen de resistencia a ampicilina y, además, dos sitios de corte para la enzima *BbsI*- HF.

### 3.3 Base de datos y diseño de los guías:

El gen *Cdx2* bovino codifica la proteína que contiene el dominio homeobox de localización nuclear de unión al ADN. Para asegurar el fenotipo de pérdida de función, se diseñó dos guías que provocarán la pérdida de un dominio esencial para su función, el dominio homeobox. En la figura 4 se observa la secuencia de aminoácidos de la proteína CDX2.

10	20	30	40	50
MYVSYLLDKD	VSMYPSSVRH	SGSLNLAPQN	FVSPQYDPY	GGYHVAAAAA
60	70	80	90	100
AAANLDSAQS	PGPSWPAAYG	APLREDWNGY	TPGGAAAAAN	AVAHGLNGGS
110	120	130	140	150
PAAAMGYSGP	ADYHPHHPH	HHPHPAAAP	SCASGLLQTL	NPGPPGPVAT
160	170	180	190	200
AAAEQLSPGG	QRRNLCEWMR	KPAQPALGSQ	VKTRTKDKYR	VVYTDHQRL
210	220	230	240	250
LEKEFHYSRY	ITIRKAEAL	ATLGLSERQV	KIWFQNRRAK	ERKINKKKLQ
260	270	280	290	300
QQQQQPPPPS	GPQPPQPQPG	PLRSVPEPLS	PVSSLQGSVP	GVLGPAGGVL
306				
NPTVTQ				

**Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína CDX2:** Resaltado en amarillo se observa el único dominio funcional. Secuencia obtenida de UniProt.

Luego de obtener la secuencia nucleotídica del primer exón del gen *Cdx2* a partir de ENSEMBL (Howe et al., 2021), se realizó el diseño de los guías utilizando el programa Breaking-Cas (Oliveros et al., 2016), al ingresarle la secuencia, este arroja una lista de posibles sgRNAs, se eligieron dos secuencias que contenían el máximo score y menor número de *off-targets* y que además flanquean la región que interesa eliminar.

Para la síntesis de los guías se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios con variaciones en los extremos (Tabla 1 sintetizados por MacroGen INC), para que se facilite la ligación utilizando *T4 DNA Ligasa (Promega)* con el vector pU6sgRNA cortado con *BbsI*-HF (*NEB NewEngland Biolab*). La enzima *BbsI*-HF es una enzima clase II que reconoce una secuencia de 6 nt y corta en las proximidades (Figura 5). El plásmido pSPgRNA tiene dos sitios de corte muy próximos, que dejan extremos no compatibles.



**Figura 5: Sitio de corte de la enzima *BbsI*-HF.** Secuencia que reconoce la enzima *BbsI*-HF y de corte, donde N es cualquier nucleótido. En el caso específico del plásmido pU6sgRNA los nucleótidos N son conocidos y facilitan la ligación colocando al 5', extremos CACC y AAAC en los oligos apareados.

Después de la digestión de pU6sgRNA con *BbsI*-HF, el plásmido cortado se purificó de un gel con el kit de PuriPrep-GP Kit de INBIO Highway y se realizó la ligación (descrito más adelante) de cada par de oligonucleótidos alineados (BtCDX2g1\_F y BtCDX2g1\_R, y BtCDX2g2\_F y BtCDX2g2\_R) con el plásmido digerido, junto con un control de religación del plásmido. Los alineamientos se realizaron agregando cantidades equimolares de cada oligo complementario en buffer de PCR, aumentando la temperatura hasta 95°C y dejando enfriar lentamente. Además, se diseñaron, utilizando el programa Primer3 (Untergasser et al., 2012), dos oligonucleótidos para una PCR externa y dos oligonucleótidos para una PCR interna, PCR anidada, de modo de amplificar el fragmento del gen *Cdx2* a editar. Estos oligonucleótidos se encuentran en la tabla 2.

**Tabla 2:** Oligonucleótidos que se utilizarán para levantar el fragmento del gen *Cdx2* bovino y los guías que dirigirán la acción de la endonucleasa Cas9.

Nombre	Secuencia 5' – 3'
Btcdx2_4F_PCR1	ACGTGAGCTACCTCCTGGAC
BtCDX2_2R_PCR1	GAACCTGTGCGAGTGGATG
BtCDX2_2F_PCR2	AGGACGTGAGCATGTATCCC
Btcdx2_4R_PCR2	GATGGTGGTGAGGGTGATG
BtCDX2g1F	CACC GACTACGGCGGATACCATGT
BtCDX2g1R	AAAC ACATGGTATCCGCCGTAGTC
BtCDX2g2F	CACCGACGCCGTAGCGCACGGCCTC
BtCDX2g2R	AAACGAGGCCGTGCGCTACGGCGTC

A continuación, se detalla la secuencia del fragmento del gen *Cdx2* bovino, y la disposición de los guías y oligonucleótidos para amplificar el segmento a delecionar (Figura 6).



GGCAGGGACCGCCTCAGAGGCAGAAGCGCCGCGAGGAGCCGGCGGAGCTTCGCGGGCCGGAGCGCAGCCA  
 CCCGCCGTTCCGGCGCCCCCTCGCCCCCTTCGCCAGCGCGGGCGCCCCCGGCAACCTCCAGCGTCCGTCC  
 CTGGGCAGCATGGTGAGGTTGCGCGTCCGGCCCTCGCCACCATGT**ACGTGAGCTACCTCCTGGACAAGGA**  
**CGTGAGCATGTATCCG**AGCTCCGTGCGCCACTCCGGCAGCCTCAACCTGGCCCCGAGAACTTCGTGAGC  
 CCCCCGCAGTACCC**GACTACGGCGGATACCATGT**GGCGGCCGCGGCCCGCCGCCAACCTGGACA  
 GCGCGCAGTCCCCGGGGCCGTCTGGCCTGCCGCTACGGCGCCCCGCTCCGCGAGGACTGGAACGGCTA  
 CACGCCGGGGGGCGCGGGCCGCCGCC**ACGCCGTAGCGCACGGCCTCA**ACGGGGGCTCCCCGGCCGCC  
 GCCATGGGCTACAGCGGGCCAGCCGATTACCACCCGCAC**CATCACCTCACCACCATG**CGCACCACCCGG  
 CCGCCGCGCCCTCCTGCGCCTCCGGCTTGCTGCAGACGCTCAACCCCGGCCCCCCCGGGCCGGTGCAC  
 CGCCCGCCGAGCAGCTGTCGCCGGCGGCCAGCGCG**GAACCTGTGCGAGTGGATG**CGGAAGCCCGCG  
 CAGCCGGCGTGGGCAGCCAAAGGTGAGCTGGCGGGCCCGGGGGAAGGCGCGGTCCCGCGCTCCGGG  
 ACTCCGCGCAAGGGGGCGGGGGCGGACCGCGTCTAGGGGGCTCTGGACCCTCCCCCGGGGGTTG  
 CTGCTCTGGACCCTGAGTAGGGGATAGCGGGTGGGAGTGGAGGTCTGGTCTCAGGAGCCGCGTTCAG  
 TGTAAGCAAAGGGGAGGCTCCCTCCTTCCACCCGCTTCTTCTGTAAGGTCGGGTCTCAGACCCTCG  
 GGAGACTCCCGGGAACGTGGCGCAGCGGGCTGCAGCGCAGTGATCGCGTCCGCCCGCTTGCTGCCTCC  
 TGTCTCGCTCGGTGCGCGGTACCTGCAGCTCCCCAAGGCCGGGCTTTAGGGGCACACCGTCTTCCC  
 TGTCCCGCCACTCAGGAAGAGCAAGGGACGGGGTCCGGGAGGGCGCGGTTCGCGCGAGGGACCAGG  
 TTTAGCCATTGGAACCAAAGGTAAGGATCGGAGCTGCCGCTGGGGAAACTGGGGGAAGCTGCCGAAGC  
 TGAAAGAAAGTGTGGTCCCGGGAACGAAGTGGGGAAGAGGTGCGGCTCGGGGGTTGGGGGAGCACCCGG  
 GTCTTCAGACCTTTGATCTGCGCAGGGGTCATTTCAATCAAAGCCGGAGGGCTGGGACTGGACGCCCCG

**Figura 6: Secuencia del fragmento del gen *Cdx2* bovino.** En mayúscula se muestra el exón 1, subrayado y en negrita la región de reconocimiento de los sgRNAs, en amarillo los oligonucleótidos externos y en verde los internos.

### 3.4- Microinyección del sistema CRISPR/Cas9 en embriones bovinos:

En el laboratorio se recuperaron ovocitos inmaduros de ovarios de matadero. Estos ovocitos se maduraron *in vitro* (MIV) por 21 a 24 horas colocados en incubadora (3111; Thermo Electron Corporation, USA) con una atmósfera de 6 % CO<sub>2</sub> en aire con 100 % de humedad a 38.5 °C, para permitir la calibración del pH. Luego los embriones fueron producidos por fecundación *in vitro*, siguiendo el protocolo desarrollado por Brackett y Oliphant (1975), con ligeras modificaciones. La co-incubación de las gametas se realizó durante 5 h en incubadora en las mismas condiciones que la MIV, en gotas de 100 µL de suspensión de espermatozoides con hasta 25 complejos oocito-cumulus (COCs) por gota. Luego, los presuntos cigotos fueron tratados con hialuronidasa (H-4272, Sigma) 1 mg/mL y sometidos a vortex durante 45 s, para remover las células del cumulus y los espermatozoides adheridos, favoreciendo así el mejor desarrollo embrionario, y fueron lavados 2 veces en medio TALP-H. Luego fueron cultivados *in vitro* hasta el día 7 post fecundación como máximo, en donde fueron recuperados bajo lupa estereoscópica, donde se seleccionaron aquellos con 2 cuerpos polares. Los embriones seleccionados fueron transferidos a gotas de 100 µL de TALP-H en una placa de Petri de 10 x 10 mm y fueron microinyectados con 10 pL de mix ADNs conteniendo ADN plasmídico que codifica CAS9 (100 ng/µL) y mix de los 2 plásmidos que codifican los ARN guías (50 ng/µL) de *Cdx2*, diluidos en 10% de polivinilpirrolidona (PVP, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). El control de microinyección (SHAM) consistió en presuntos cigotos microinyectados con 100 ng/µL de CAS9, sin guías. Para la microinyección se utilizó una pipeta de 9 µm (HG-MIC-9UM, Origio Inc., Charlottesville, Dinamarca) y una pipeta de sujeción (MPH-MED-30, Origio Inc.,

Charlottesville, Dinamarca) ubicadas en inyectores de aire (Narishige), ambas acopladas al microscopio invertido Nikon Eclipse TE-300 (Nikon, Melville, NY, USA). Luego de la microinyección, los embriones fueron cultivados en grupos de 20, en gotas de 50 µl de SOFaa, cubiertas por aceite mineral (M8410, Sigma). Los embriones fueron cultivados en cámara cerrada con una mezcla de gas humidificado (5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub>, 90 % de N<sub>2</sub>) a 38.5 °C. Al día 2 post fecundación, fueron cambiados a una gota de medio de cultivo SOFaa fresco previamente calibrado. Se evaluó el desarrollo a blastocistos al día 7 y, en el día de colecta, los embriones fueron congelados individualmente en el medio de cultivo del cual provenían para su posterior estudio de edición génica. Los embriones inyectados tenían 5-10 pL de la mix (tabla 1).

**Tabla 1:** volúmenes y cantidades de los componentes de la mix del sistema CRISPR/Cas9 inyectado en embriones.

	KO CDX2
CAS9 (346,8ng/µL)	0,86 µL (hp wt)
pU6sgRNA1 (359,7ng/µL)	0,2 µL
pU6sgRNA2 (346,5ng/µL)	0,2 µL
PVP	1,75 µL
H2O gibco	-----

## 4 - Resultados



## 4 – Resultados:

El gen *Cdx2* codifica una proteína que contiene un dominio homeobox de unión al ADN. Para provocar una pérdida de función, se diseñaron dos guías flanqueando un dominio esencial para su función (ver materiales y métodos) y se estudiaron los efectos de estas guías en bovinos.

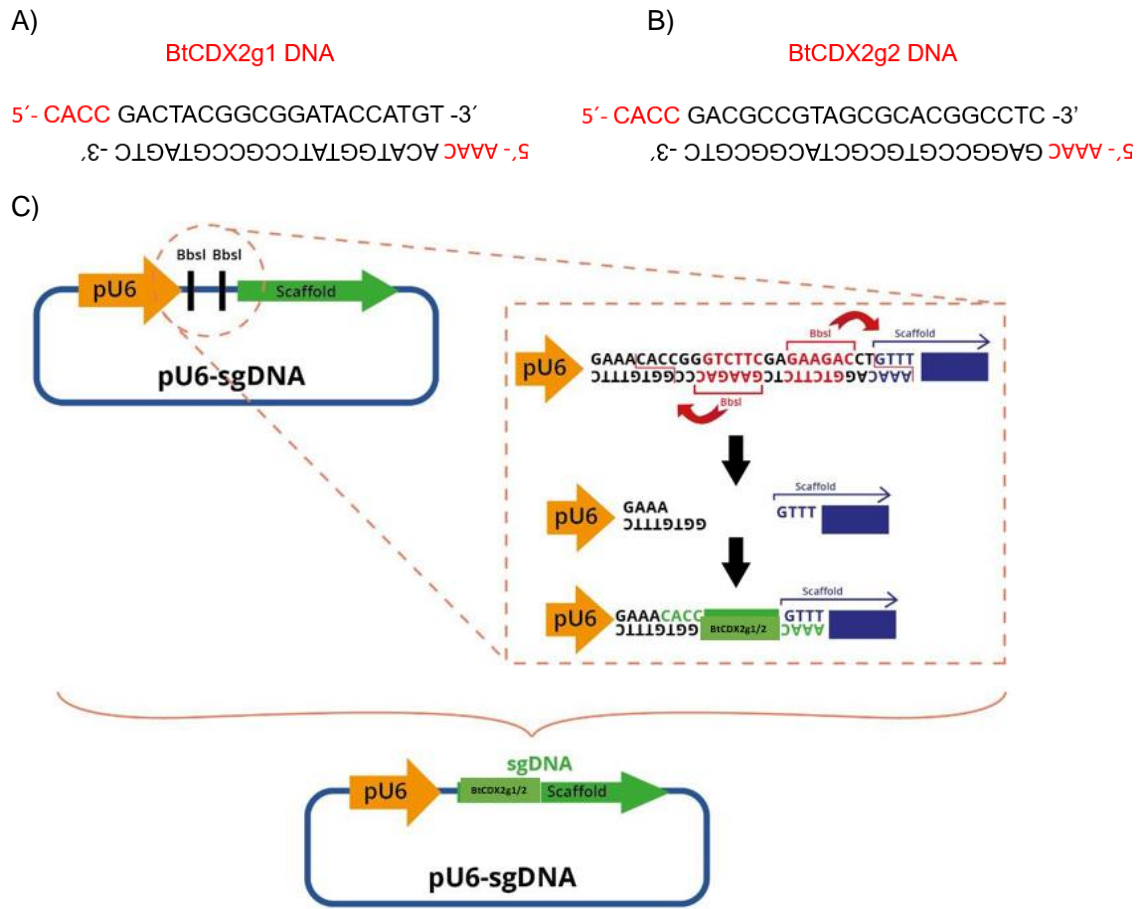
### 4.1 - Reconstrucción de los guías:

El plásmido pU6-sgRNA fue digerido con la enzima *BbsI*-HF, lo cual produjo extremos no cohesivos entre sí, pero complementarios a los extremos de los oligonucleótidos alineados que se describirá después. Para la digestión se utilizó un volumen final de 20 µL con 1 µL de enzima, 5 µg de DNA y 2 µL de buffer. El producto de la digestión se corrió en una electroforesis. Se purificó el ADN de la banda resultante con ADN PuriPrep-GP Kit de INBIO.

Los oligonucleótidos BtCDCX2g1\_F y BtCDCX2g1\_R, y, por otro lado, BtCDX2g2\_F y BtCDX2g2\_R, se alinearon para formar las secuencias que codifican el segmento de los sgRNAs que reconocen sus secuencias *target* complementarias en el gen *Cdx2* (Figura 7). El apareamiento de los oligonucleótidos por parejas para ser insertados en el plásmido pU6-sgRNA se realizó agregando cantidades equimolares de cada uno en buffer de PCR, aumentando la temperatura hasta 95°C durante 5 minutos, y luego dejando enfriar lentamente.

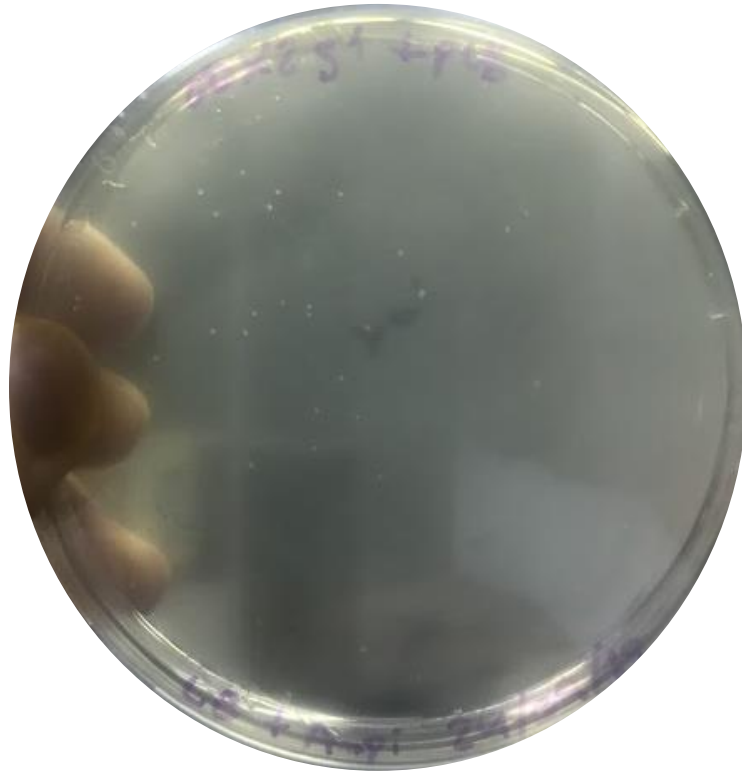
Ambos guías fueron insertados independientemente en el plásmido pU6-sgRNA bajo el promotor U6 y adyacente a la secuencia *scaffold*, que codifica la sección del sgRNA y asocia a Cas9 (Figura 7). La ligación se realizó junto con un control de religación del plásmido.

Luego de la ligación de cada par de oligonucleótidos alineados con el plásmido pU6-sgRNA digerido con *BbsI*-HF, se transformaron bacterias *E. coli DH5α* competentes y se plaquearon en medio LB sólido suplementado con ampicilina para seleccionar las bacterias que hayan incorporado el plásmido.



**Figura 7: Esquema de reconstrucción de los guías** A) Secuencia del ARN guía 1 (BtCDX2g1) clonada en el plásmido pU6-sgRNA. B) Secuencia del ARN guía 2 (BtCDX2g2) clonada en el plásmido pU6-sgRNA. C) Procedimiento para la inserción de la secuencia de los sgRNAs en el plásmido pU6-sgRNA.

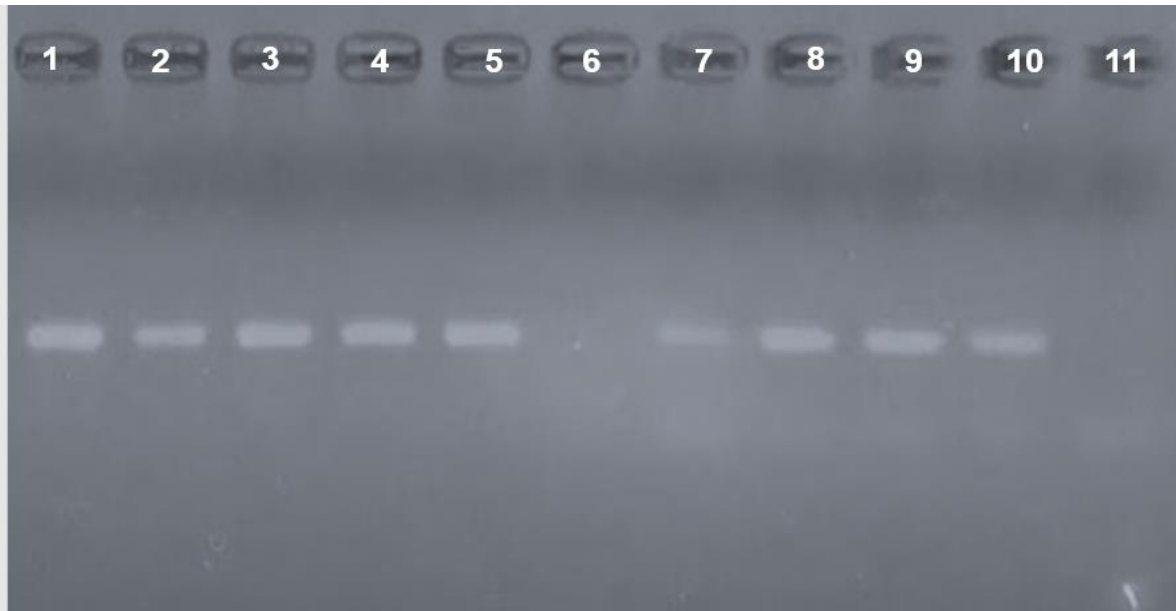
Se realizaron 3 transformaciones: 1) la ligación pU6-sgRNA *BbsI* + BtCDX2g1, 2) la ligación pU6-sgRNA *BbsI* + BtCDX2g2 y 3) el control de religación pU6-sgRNA *BbsI*. En el tratamiento control, pU6 + LB líquido, no se formaron colonias. En la placa de cultivo en la que se realizó el tratamiento 1, pU6-sgRNA con la secuencia del sgRNA 1 se formaron 41 colonias y en el caso de la placa de cultivo, tratamiento 2, con el plásmido pU6-sgRNA 2 se obtuvieron 77 colonias (Figura 8).



**Figura 8: Placa de cultivo con formación de colonias de *E. Coli* transformadas. A)** Tratamiento 1: Cdx2g1 + pU6 (LB+Ampicilina): 41 colonias.

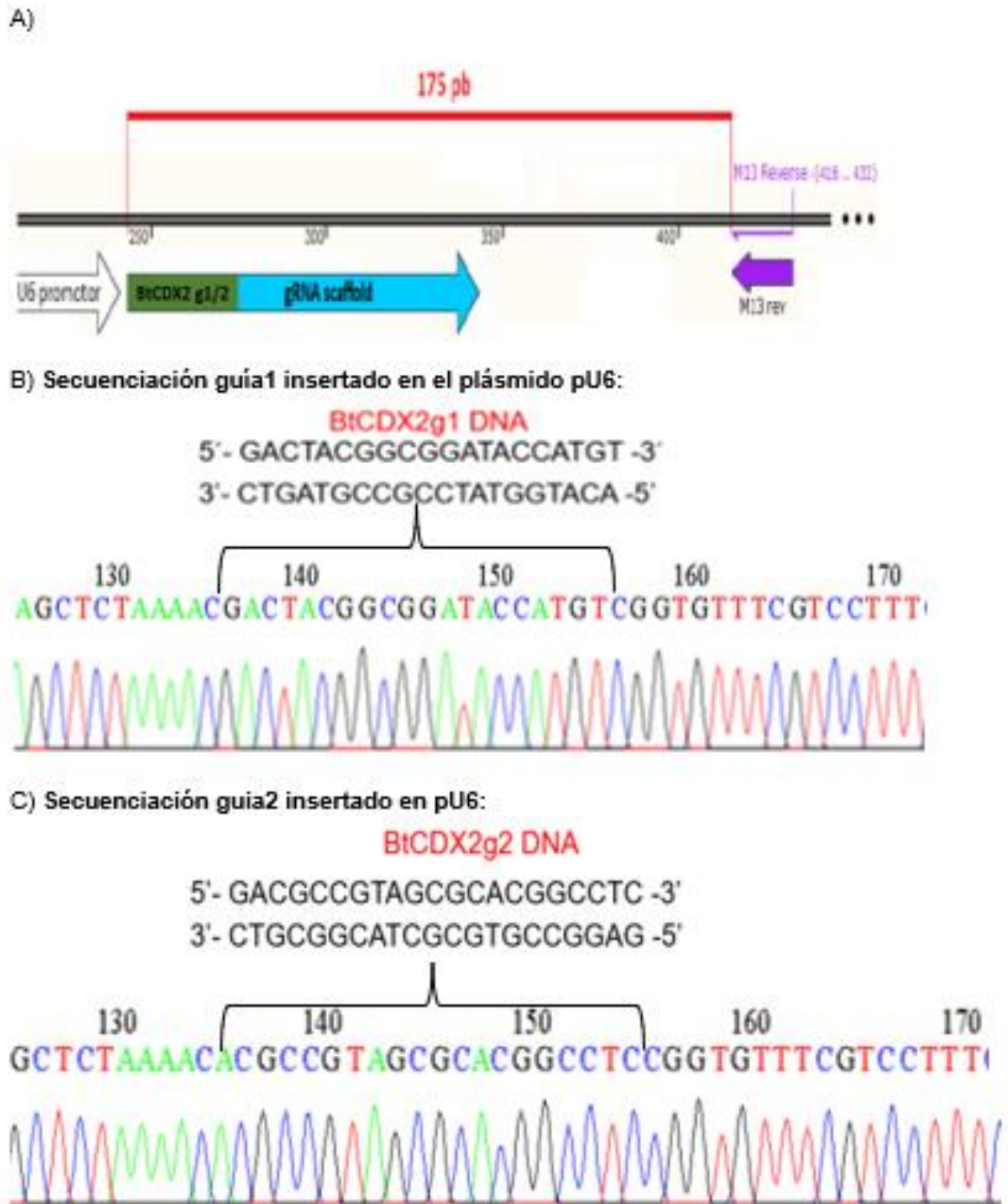
El análisis de las colonias resultantes de la transformación de la ligación del vector cortado con *BbsI*-HF y los oligonucleótidos apareados se realizó en una primera instancia por *colony* PCR. Las colonias resultantes se tocan con la punta de un escarbadiantes estéril, se realiza una estría en medio sólido de cada una para tener una réplica de las bacterias y disminuir la carga bacteriana, se toca con la punta del escarbadiantes la mezcla de PCR y se deja en cultivo líquido de LB con ampicilina para realizar una miniprep el día siguiente. Las bacterias resuspendidas en la mezcla de PCR, se lisan por las altas temperaturas de la reacción de ciclado y liberan plásmidos que sirven de molde. La *colony* PCR se realizó utilizando un *primer* forward complementario a la secuencia de los sgRNAs, y un *primer* reverse universal M13. Las condiciones para la PCR fueron a 94°C durante 5 minutos, luego 35 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos, para luego finalizar en 72°C durante 5 minutos.

A los productos de la *colony* PCR se los corrió en una electroforesis (Figura 9). Todas las colonias evaluadas dieron positivas para la *colony* PCR. Se obtuvieron 5 clones del plásmido pU6- sgRNA con la secuencia sgRNA 1 (calles 1-5) y 4 clones con la secuencia sgRNA2 (calles 7-10).



**Figura 9: Colony PCR** Corrida electroforética en gel de agarosa 2% con 100V durante 30 minutos. Calle 1-5) clones resultantes de la ligación de restitución del guía 1; Calle 7-10) clones resultantes de la ligación de restitución del guía 2; Calle 6 y 11) control sin ADN.

A un inóculo positivo de cada guía se les realizó una miniprep con QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) para extraer selectivamente ADN plasmídico. Las minipreps fueron cuantificadas por absorbancia en un nanodrop (Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 Thermo), dando como resultado una concentración de ADN plasmídico conteniendo el guía 1 de 359,7ng/ $\mu$ L y el plásmido del guía 2, 346,5 ng/ $\mu$ L. Estos plásmidos se secuenciaron en la plataforma de MACROGEN, para corroborar que el plásmido posee insertadas las secuencias de los sgRNAs. El análisis de los resultados de las secuenciaciones se realizó mediante un alineamiento de secuencias nucleotídicas utilizando BLAST y verificación en los cromatogramas. El resultado de la secuenciación comprobó que los guías se habían reconstituidos correctamente (Figura 10). La secuencia de los sgRNAs no sufrió ningún cambio, lo cual es necesario para que los ARN guías puedan dirigir los cortes en el gen *Cdx2* de forma correcta.



**Figura 10:** A) Distancia entre las secuencias insertadas de los guías en el plásmido pU6-sgRNA y el oligonucleótido M13 rev utilizado para la secuenciación. B) Resultado de la secuenciación de un clon que contiene la secuencia BtCDX2g1 en el plásmido pU6-sgRNA. C) Resultado de la secuenciación de un clon que contiene la secuencia BtCDX2g2 en el plásmido pU6-sgRNA.



#### 4.2 - Edición la región esencial para la función de *Cdx2*:

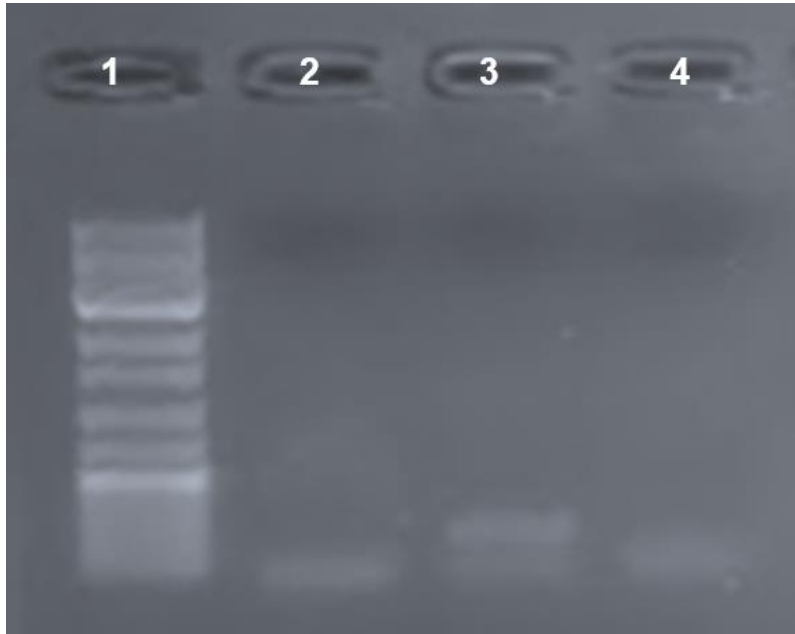
El corte dirigido por ambos sgRNAs generará la deleción del fragmento que flanquean las secuencias *target*, a las cuales se hibridan por complementariedad de bases. La deleción, de aproximadamente 150 pb en el gen *Cdx2*, se estudiará en embriones que son un clon de 100-150 células. Solo podremos observar la deleción en embriones inyectados con los plásmidos correspondientes a CAS9 y ambos sgRNAs.

Para evidenciar si la deleción deseada ocurre, se realizó una *nested* PCR con los oligonucleótidos que flanqueen el primer exón del gen *Cdx2*. Al partir de baja cantidad de ADN para la PCR, ya que se parte de poca cantidad de células, se realizó en primer lugar una PCR externa con los oligonucleótidos Btcdx2\_4F\_PCR1 y BtCDX2\_2R\_PCR1, seguida de una PCR interna con el producto sintetizado en la anterior PCR, utilizando los oligonucleótidos BtCDX2\_2F\_PCR2 y Btcdx2\_4R\_PCR2. En los casos que ocurriese deleción, al correr en una electroforesis el producto de ambas PCR, se observaría una banda de aproximadamente 190 pb; mientras que, contrariamente, se observaría una banda de aproximadamente 342 pb si no ocurriese la deleción deseada.

No hubo amplificación a una temperatura de hibridación de 60°C. Luego se utilizó una temperatura en gradiente en un rango de 56°C a 64°C, para ambas PCR, interna y externa, utilizando ADN genómico bovino, y tampoco se obtuvo un resultado positivo, de amplificación (figura 11). Por últimos se utilizó para PCR externa una concentración cloruro de magnesio de 2,5mM, más permisiva, lo que da menor especificidad de amplificación, y para la PCR interna una concentración de 1,25mM, dando mayor especificidad, obteniendo el mismo resultado negativo, ausencia de amplificación (figura 12).



**Figura 11: Corrida electroforética en gel de agarosa 2 % con 90V durante 30 minutos. Calle 1) Marker; Calle 2) 56°C; Calle 3) 58°C; Calle 4) 60°C; Calle 5) 62°C; Calle 6) 64°C; Calle 7) control negativo a 60°C.**



**Figura 12: Corrida electroforética en gel de agarosa 2 % con 90V durante 20 minutos.** Calle 1) Marker; Calle 2 y 3) ADN genómico; Calle 4) Control negativo sin ADN.

Lamentablemente la ausencia de amplificación no permitió el estudio de la región del primer exón del gen *Cdx2* en embriones bovinos. Este fue uno de los puntos más débiles de la Tesis, ya que no pudimos amplificar la región. Sobre las condiciones estándares descritas en materiales y métodos modificamos la temperatura de apareamiento y la concentración de  $Cl_2Mg$ , pero no conseguimos una amplificación, ni a partir de embriones ni a partir de 10 ng de DNA genómico. Esto será discutido en la discusión. Aunque no pudimos estudiar la región, inyectamos los plásmidos codificantes del sistema CRISPR/CAS9 y de sus guías específicos para *Cdx2*, esperando observar un efecto en el desarrollo embrionario.

#### **4.3 - Desarrollo de los embriones bovinos microinyectados con el sistema CRISPR/Cas9 específico para *Cdx2*:**

Al día 7 del desarrollo de blastocistos se observaron bajo lupa estereoscópica y se tomó nota de su desarrollo para luego congelarlos individualmente en el medio de cultivo del cual provenían para su posterior análisis. Se guardaron un total de 65 blastocistos, de los cuales 22 blastocistos se observaron expandidos con MCI definido, 8 blastocistos no expandidos con MCI definido, 1 blastocisto no expandido con MCI irregular, 1 blastocisto colapsado con calidad 2/3, 3 blastocistos no expandidos con calidad 2/3, 10 blastocistos tempranos que presentaban MCI definido y 19 en estado de mórula. En la tabla 3 se observa que los grupos FIV control hay un 87,8% clivaje y 40,2% de blastocistos, en el caso de control SHAM se vio un 92,2% de clivaje y 44,8% de blastocistos, por último, los embriones

microinyectados con el sistema CRISPR/Cas9 y los plásmidos codificantes de las guías para *Cdx2* presentaron un 92,2% de clivaje y 40% de blastocistos. Por lo tanto, no se observó una reducción del desarrollo ni en la calidad de los embriones.

**Tabla 3:** Desarrollo embrionario *in vitro* preimplantatorio día 2 clivaje y día 7 blastocisto post fecundación.

<b>Grupos</b>	<b>Clivaje (%)</b>	<b>Blastocistos (%)</b>
<b>FIV control</b>	72/82 <b>(87,8)</b>	33/82 <b>(40,2)</b>
<b>Control SHAM</b>	107/116 <b>(92,2)</b>	35/78 <b>(44,8)</b>
<b>Inyectados con sistema CRISPR/Cas9</b>	71/77 <b>(92,2)</b>	46/115 <b>(40)</b>

No se encontraron diferencias estadísticas en el desarrollo preimplantatorio de los embriones bovinos inyectados con el sistema CRISPR/Cas9 específico para *Cdx2*. Estos resultados serán discutidos más adelante.

## 5 – Discusión



## 5 - Discusión

La edición génica en bovinos permite modificaciones genéticas precisas con aplicaciones múltiples que van desde la mejora genética de los rasgos productivos hasta usos biomédicos (Jabbar et al., 2021). Los embriones bovinos son un modelo utilizado para estudiar los mecanismos fundamentales del desarrollo embrionario temprano, además es importante generar información básica ya que el bovino es una especie pecuaria importante para la producción de leche y carne. Un ejemplo son las anomalías placentarias detectadas en embriones cultivados *in vitro* (Li et al., 2019; Young et al., 1998). Las causas de LOS son los cambios relativos en la transcripción de varios genes importantes para el desarrollo inducidos por factores de crecimiento presentes en el suero fetal bovino utilizado para el cultivo *in vitro*. En los embriones de mamíferos, la primera diferenciación celular se da en la transición de mórula a blastocisto, cuando se forma el linaje ICM y TE, eventos celulares que ocurren en los primeros días post fecundación y están en los orígenes de las anomalías en el desarrollo embrionario descritas por LOS (Goissis & Cibelli, 2014).

Las alteraciones en la expresión génica que dan lugar al desarrollo anormal de los linajes ICM y TE se ven asociadas a fallas de implantación y en desarrollo normal de la placenta que derivan, con alta frecuencia, en pérdidas de gestación. Por lo tanto, es importante comprender los mecanismos que dirigen la diferenciación celular en embriones preimplantatorios, por lo tanto, resulta importante generar nuevas estrategias que permitan la producción de embriones con un alto potencial de generar y mantener la preñez.

En los bovinos, *Cdx2* se expresa a partir de 8 células y se localiza exclusivamente, al igual que en ratón, en el TE del blastocisto, aunque se demostró que no es esencial para el establecimiento, pero sí para su mantenimiento e integridad (Berg et al., 2011). La modificación genética precisa de animales era difícil y requería tiempos muy prolongados, y estaba restringida a ratones. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas para la edición génica, como lo es la tecnología CRISPR/Cas9, lo que permite la generación de animales genéticamente modificados sea más fácil y más disponible.

En este trabajo se intentó analizar el gen *Cdx2* con el objetivo de la delección de un fragmento del primer exón traducido de este gen, el cual contiene las secuencias que codifican los aminoácidos que conforman el sitio activo de la enzima. Para esto se decidió utilizar la herramienta CRISPR/Cas9, la cual consiste en una endonucleasa sitio-específica: la endonucleasa Cas9 se une a un ARN guía que la dirige a una secuencia específica, a la cual se une por complementariedad de bases, para que realice el corte doble hebra en el ADN. El sistema CRISPR/Cas9 utilizado en este proyecto se diseñó, se evaluó y se aplicó en embriones bovinos. El sistema CRISPR/Cas9 cuenta con las nucleasas programables sitio-específicas, capaces de inducir modificaciones puntuales en secuencias específicas del genoma, que presentarían gran potencial para el estudio de los mecanismos involucrados en la diferenciación al linaje TE, principalmente en aquellas especies

en las que la manipulación del genoma era tradicionalmente laboriosos y poco eficiente, como es el caso del bovino. Estas herramientas permiten generar alelos *knock-out* en muchas especies, sin la necesidad de desarrollar células madre embrionarias, lo que permite estudiar en nuevas especies la diferenciación de los linajes ICM y TE. La principal ventaja del sistema CRISPR/Cas9 sobre las otras tecnologías nucleasas, radica en la posibilidad de editar diferentes secuencias de ADN, sencillamente cambian una secuencia de 20 nt del sgRNA, siendo la misma enzima Cas9 adecuada para todas las secuencias. Esto vuelve al sistema una herramienta sumamente versátil y económica.

Al diseñar el sistema, se decidió utilizar dos ARN guías que dirijan el corte de la CAS9 en dos secuencias que flanqueen el fragmento que se deseaba deletar. Las secuencias de estos guías se diseñaron utilizando Breaking-Cas, se sintetizaron y clonaron en plásmidos que las exprese, pU6-sgRNA, los cuales se transformaron en bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$ . Se analizaron las colonias resultantes de la transformación a través de *conoly* PCR, a estos productos de amplificación fueron corridos en una electroforesis. Luego, a los inóculos positivos de cada guía se les realizó miniprep para extraer el ADN plasmídico, fueron cuantificados por absorbancia y envidados a secuenciar para corroborar que el plásmido posee insertadas las secuencias de los sgRNAs. A través del resultado de la secuenciación comprobamos que los guías se habían reconstituido correctamente, lo cual permitiría dirigir los cortes en el gen *Cdx2* de forma correcta.

Pese a diseñar dos pares de oligonucleótidos, no tuvimos éxito en la amplificación de la región del gen *Cdx2*, de 10 ng de ADN genómico bovino como de ciertos embriones. Es la primera vez que utilizando la base de datos de Ensembl no conseguimos amplificar el gen deseado. En paralelo, otros integrantes del grupo de investigación, realizaron amplificaciones de otros genes. La única explicación que tenemos para este resultado inesperado es la presencia de polimorfismos entre los genomas estudiados y los publicados.

En Ensembl, el exón elegido para amplificar por PCR o para editar con el sistema CRISPR/Cas9 no presenta SNPs (del inglés- Single Nucleotide Polymorphism), conocidos (figura 13), aunque si muestra una gran cantidad de SNPs en los exones 2 y 3. Esto podría indicar que un polimorfismo similar debería de estar presente en el primer exón, aunque la base de datos no lo haya registrado.

Cuando los embriones fueron observados en la lupa se vio que no hubo una reducción de su desarrollo preimplantatorio ni en su calidad embrionaria. En los embriones SHAM se observó 92,2% de clivaje y 40,2 % de blastocisto, en el caso de los embriones KO hubo 92,2% de clivaje y 40% de blastocisto.

Independientemente de que no hayamos podido registrar ediciones en el gen *Cdx2*, la ausencia de modificaciones en el desarrollo preimplantatorio de los embriones bovinos inyectados con el sistema CRISPR/Cas9 parece indicar que, de igual forma, los polimorfismos de esta región pueden también haber afectado la eficiencia de los guías. Aunque también, podríamos especular con la idea de que el armado del

sistema CRISPR/Cas9, después de la activación de la transcripción embrionaria, puede estar sucediendo luego de que el embrión haya acumulado suficiente cantidad de proteína CDX2 para no encontrar alteraciones en el desarrollo embrionario preimplantatorio. Esto podría ser corregido con la microinyección en cigotas de los complejos CRISPR/Cas9 armados, para lo que se precisa una transcripción *in vitro* del guía y la utilización de proteína CAS9, la cual es comercial. De esta forma nos independizamos de la necesidad de expresar la proteína y el guía en los embriones, hecho que precisa de la activación transcripcional del embrión, evento que en bovinos ocurre en estadio de 4-8 células.

```

.....ggaggaggcaggcccgaggcagggaccgcctcagaggcagaagcgccgcg
AGGAGCCGGCGGAGCTTCGCGGGCCGGAGCGCAGCCACCCGCCGTTCCGGCGCCCCCTCG
CCCCCTTCGCCAGCGCGGGCGCCCCCGGCAACCTCCAGCGTCCGTCCCTGGGCAGCATGG
TGAGGTTTCGCCGTGGGGCCCTCGCCACCATGTACGTGAGCTACCTCCTGGACAAGGACGT
GAGCATGTATCCAGCTCCGTGCGCCACTCCGGCAGCCTCAACCTGGCCCCGCAGAACTT
CGTCAGCCCCCGCAGTACCCGGACTACGGCGGATACCATGTGGCGGCCGCGGGCCGCCGC
GGCCGCAACCTGGACAGCGCGCAGTCCCGGGCCGTCCTGGCCTGCCGCTACGGCGC
CCCGCTCCGCGAGGACTGGAACGGCTACACGCCGGGGGGCGCGGCCGCCGCCGCGCAACGC
CGTAGCGCACGGCCTCAACGGGGGCTCCCCGGCCGCCATGGGCTACAGCGGGCCAGC
CGATTACCACCCGCACCATCACCCCTCACCACCATCCGCACCACCCGGCCGCCGCGCCCTC
CTGCGCCTCCGGCTTGCTGCAGACGCTCAACCCCGGCCCCCCGGGCCGGTCCGCCACCGC
CGCCGCGAGCAGCTGTGCCCCGGCGGCCAGGGCGGAACCTGTGCGAGTGGATGCGGAA
GCCCGCGCAGCCGGCGCTGGGCAGCCAAG

gtgagctgycgggycgggggaag.....gggctaactttgccttccacag
TGAAAACAGGAGCGAAGACAAATACCGGGTGTGTACACGGACCACCAGCGTCTGGAGC
TGGAGAAGGAGTTTCACTACAGTCGCTATATCAACATCCGGAGGAAGCCGAAGTGGCCG
CCACGCTGGGGCTCTCAGAGAGCAG

gtgggaaccctccagggccccgtca.....ttttctccacctttttcatttccag
GTTAAATTGGTTTCAACAACCCTAGAGCAAAGCAAAAGGAAATCAACAAGAAAGATTG
CAACAGCAGCAGCAACAGCCCTCCCTCTGTGGCCACAGCCCTCCAGCCACAGCCA
GGTCCGCTGAGAAGCGTCCAGAGCCCTGAGCCCCGTGTCTTCCCTGCAAGGCTCAGTG
CCTGGGGTTCGGGGCCAGCTGGGGGGTGTAAACCCTACTGTCACCCAGTGACCCGCA
GCGCCCTCAGTAGCAATTCCAGGCTCAGCCATGAGGAGCATGACTCTGCTAGAACCCT
CAGGAAGACCCCTCCCTCTCACTCACAAATGTTTACAGCTGACCTAGCCCTCCGAG
CAGAAACAAAGGGGGCCTGGGGAAAGACGACTGTGTTGGGGGCCTCAAGGATGACAT
TCTCCTAGATTGGCACTTTTTCCGTTCTGA

ctctttctgccaagtgaggagatgggaaaagacaccgggcttcccttag.....

```

**Figura 13:** Secuencia de los exones del gen *Cdx2* obtenida de ENSEMBL. Con letra azul se muestran los 3 exones del gen.

Pese a que no se pudo evidenciar la edición génica del gen *Cdx2*, se logró microinyectar una gran cantidad de embriones, 65, los cuales continuaron su desarrollo normal, posiblemente debido a la ausencia de edición. Sin alteración notable del desarrollo embrionario perjudicial respecto a los FIV control, tal como ocurrió en el trabajo de que utilizó CRISPR-on el cual no alteró el desarrollo preimplantatorio de los embriones bovinos (Savy et al., 2020).

Lamentablemente el trabajo no puede ser concluyente porque debido a las

restricciones COVID, el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía de la Ciudad de Buenos Aires estuvo cerrado durante 17 meses, lo que no nos permitió diseñar nuevos oligonucleótidos para levantar el *locus* de *Cdx2* y determinar si hubo edición génica o no. Los embriones se mantendrán preservados a la espera de que podamos optimizar la PCR de esta región, para que puedan ser estudiados individualmente por otro estudiante.

Se puede concluir que es factible, sencillo y económico la reconstrucción de guías específicos para una secuencia determinada lo que permite la obtención de KO en cualquier especie y la utilización del sistema CRISPR/Cas9 para el estudio de las decisiones sobre el destino de las células embrionarias tempranas en embriones de ganado y otros mamíferos, así como para diseñar estrategias novedosas que puedan conducir a un mejor desarrollo del trofoectodermo.



## 6 - Conclusión



## **6 – Conclusión**

A partir de los resultados expuestos, se puede elaborar las siguientes conclusiones:

- es factible, sencillo y económico la reconstrucción de ARN guías específicos para una secuencia determinada dentro del genoma bovino utilizando el sistema CRISPR/Cas9 lo que permite la obtención de células knock-out en cualquier especie.

## 7 - Referencias bibliográficas:

- Adjaye, J., Herwig, R., Brink, T. C., Herrmann, D., Greber, B., Sudheer, S., Groth, D., Carnwath, J. W., Lehrach, H., & Niemann, H. (2007). Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. *Physiological Genomics*, 31(2), 315–327.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00041.2007>
- Ashry, M., Lee, K. B., Folger, J. K., Rajput, S. K., & Smith, G. W. (2018). Follistatin supplementation during in vitro embryo culture improves developmental competence of bovine embryos produced using sex-sorted semen. *Reproductive Biology*, 18(3), 267–273.  
<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.06.004>
- Ashry, M., Lee, K., Mondal, M., Datta, T. K., Folger, J. K., Rajput, S. K., Zhang, K., Hemeida, N. A., & Smith, G. W. (2015). Expression of TGF $\beta$  superfamily components and other markers of oocyte quality in oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: Relevance to early embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, 82(3), 251–264.  
<https://doi.org/10.1002/mrd.22468>
- Augustin, R., Pocar, P., Navarrete-Santos, A., Wrenzycki, C., Gandolfi, F., Niemann, H., & Fischer, B. (2001). Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 60(3), 370–376.  
<https://doi.org/10.1002/mrd.1099>
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, 17(1), 126–140.  
<https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Barnes, F., & Eyestone, W. (1990). Early Cleavage and the Maternal Zygotic Transition in Bovine Embryos. *Theriogenology*, 33, 141–152.
- Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., & Wu, G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: Interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology*, 8(3), 179–211. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60012-6](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60012-6)
- Berg, D. K., Smith, C. S., Pearton, D. J., Wells, D. N., Broadhurst, R., Donnison, M., & Pfeffer, P. L. (2011). Trophectoderm Lineage Determination in Cattle. *Developmental Cell*, 20(2), 244–255.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.003>
- Cao, Z., Carey, T. S., Ganguly, A., Wilson, C. A., Paul, S., & Knott, J. G. (2015). Transcription factor AP-2 $\gamma$  induces early CdX2 expression and represses HIPPO signaling to specify the trophectoderm lineage. *Development (Cambridge)*, 142(9), 1606–1615. <https://doi.org/10.1242/dev.120238>

- Chavatte-Palmer, P., Camous, S., Jammes, H., Le Cleac'H, N., Guillomot, M., & Lee, R. S. F. (2012). Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*, 33(SUPPL.), S99–S104. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.012>
- Chen, Z., Hagen, D. E., Elsik, C. G., Ji, T., Morris, C. J., Moon, L. E., & Rivera, R. M. (2015). Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(15), 4618–4623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422088112>
- Chow, B. (1997). in Cattle. *Vaccine*, 15(10), 1057–1064.
- Datta, N., & Kontomichalou, P. (1965). © 1965 Nature Publishing Group. *Nature Publishing Group*, 208(5007), 239–241.
- Degrelle, S. A., Campion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., Renard, J. P., & Hue, I. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology*, 288(2), 448–460. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.043>
- Dietrich, J. E., & Hiiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development*, 134(23), 4219–4231. <https://doi.org/10.1242/dev.003798>
- Dobrinsky, R. (1992). of Intracellular Concentrations in Fertilized. *Biology of Reproduction*, 969, 960–969.
- Donnison, M., Beaton, A., Davey, H. W., Broadhurst, R., L'Huillier, P., & Pfeffer, P. L. (2005). Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development*, 132(10), 2299–2308. <https://doi.org/10.1242/dev.01819>
- El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M. A., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological Genomics*, 28(1), 84–96. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00111.2006>
- Georgiades, P., & Rossant, J. (2006). Ets2 is necessary in trophoblast for normal embryonic anteroposterior axis development. *Development*, 133(6), 1059–1068. <https://doi.org/10.1242/dev.02277>
- Goissis, M. D., & Cibelli, J. B. (2014). Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 81(10), 962–970. <https://doi.org/10.1002/mrd.22415>
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H., & Wolf, E. (2014). Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal Reproduction Science*, 149(1–2), 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.016>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Harrison, H., & Holm, J. (1995). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. 246(95), 1–70.

- Home, P., Ray, S., Dutta, D., Bronshteyn, I., Larson, M., & Paul, S. (2009). GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28729–28737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016840>
- Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Ridwan Amode, M., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., ... Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
- Jabbar, A., Zulfiqar, F., Mahnoor, M., Mushtaq, N., Zaman, M. H., din, A. S. U., Khan, M. A., & Ahmad, H. I. (2021). Advances and Perspectives in the Application of CRISPR-Cas9 in Livestock. *Molecular Biotechnology*, 63(9), 757–767. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00347-2>
- Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), 49–55. <https://doi.org/10.1038/nrm3486>
- Kararoudi, M. N., Hejazi, S. S., Elmas, E., Hellström, M., Kararoudi, M. N., Padma, A. M., Lee, D., & Dolatshad, H. (2018). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 gene editing technique in xenotransplantation. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01711>
- Krisher, R. L. (2012). Utility of animal models for human embryo culture development: Domestic species. *Methods in Molecular Biology*, 912, 27–37. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-971-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-971-6_3)
- Kuckenber, P., Buhl, S., Woynecki, T., van Fürden, B., Tolkunova, E., Seiffe, F., Moser, M., Tomilin, A., Winterhager, E., & Schorle, H. (2010). The Transcription Factor TCFAP2C/AP-2 $\gamma$  Cooperates with CDX2 To Maintain Trophectoderm Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 30(13), 3310–3320. <https://doi.org/10.1128/mcb.01215-09>
- Lamas-Toranzo, I., Guerrero-Sánchez, J., Miralles-Bover, H., Alegre-Cid, G., Pericuesta, E., & Bermejo-Álvarez, P. (2017). CRISPR is knocking on barn door. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 39–47. <https://doi.org/10.1111/rda.13047>
- Lee, S. H., Kwon, J. W., Choi, I., & Kim, N. H. (2016). Expression and function of transcription factor AP-2 $\gamma$  in early embryonic development of porcine parthenotes. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8), 1197–1205. <https://doi.org/10.1071/RD14198>
- Li, Y., Donnelly, C. G., & Rivera, R. M. (2019). Overgrowth Syndrome. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 35(2), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.02.007>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., & Pazos, F. (2016). Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*,

- 44(W1), W267–W271. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>
- Ozawa, M., Sakatani, M., Yao, J., Shanker, S., Yu, F., Yamashita, R., Wakabayashi, S., Nakai, K., Dobbs, K. B., Sudano, M. J., Farmerie, W. G., & Hansen, P. J. (2012). Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Developmental Biology*, *12*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-33>
- Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J. S., & Rossant, J. (2010). Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development*, *137*(3), 395–403. <https://doi.org/10.1242/dev.038828>
- Ralston, A., & Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Developmental Biology*, *313*(2), 614–629. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.054>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, *8*(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rossant, J. (2004). Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *15*(5), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.04.003>
- Savy, V., Alberio, V., Canel, N. G., Ratner, L. D., Gismondi, M. I., Ferraris, S. F., Fernandez-martín, R., Knott, J. G., Bevacqua, R. J., & Salamone, D. F. (2020). *AUTHOR COPY ONLY REPRODUCTION TFAP2C expression in bovine embryos*. 1626.
- Singh, P., & Ali, S. A. (2021). Impact of CRISPR-cas9-based genome engineering in farm animals. *Veterinary Sciences*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/vetsci8070122>
- Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., & Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*, *132*(9), 2093–2102. <https://doi.org/10.1242/dev.01801>
- Tanaka, S., Kunath, T., & Hadjantonakis, A. (1998). a - Cosk. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(December), 2072–2075.
- Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C. S., Lambert, M. G., & Tervit, H. R. (1998). Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology*, *49*(6), 1239–1249. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00071-5)
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vejlsted, M., Avery, B., Schmidt, M., Greve, T., Alexopoulos, N., & Maddox-Hyttel, P. (2005). Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. *Biology of Reproduction*, *72*(3), 678–686. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.034348>
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R. A., Sasaki, H., & Ralston, A. (2014). HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass

- Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst. *PLoS Genetics*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004618>
- Williams, C. J. (2002). Signalling mechanisms of mamalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*, 8(4), 313–321. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.4.313>
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. W., & Niemann, H. (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development*, 53(1), 8–18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K)
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Keskindepe, L., Martins, A., Sirisathien, S., Brackett, B., & Niemann, H. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human Reproduction*, 16(5), 893–901. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.893>
- Young, L. E., Fernandes, K., McEvoy, T. G., Butterwith, S. C., Gutierrez, C. G., Carolan, C., Broadbent, P. J., Robinson, J. J., Wilmut, I., & Sinclair, K. D. (2001). Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*, 27(2), 153–154. <https://doi.org/10.1038/84769>
- Young, L. E., Sinclair, K. D., & Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, 3(3), 155–163. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030155>
- Zhenhua, G., Rajput, S. K., Folger, J. K., Di, L., Knott, J. G., & Smith, G. W. (2017). Pre- and Peri-/Post-compaction follistatin treatment increases in vitro production of cattle embryos. *PLoS ONE*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170808>